

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 717 704**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/00

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2015 PCT/US2015/024149**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15153912**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2015 E 15718304 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 3126383**

(54) Título: **Cadena J modificada**

(30) Prioridad:

03.04.2014 US 201461974738 P

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

24.06.2019

(73) Titular/es:

**IGM BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
325 E. Middlefield Rd.
Mountain View, CA 94043, US**

(72) Inventor/es:

**KEYT, BRUCE;
PRESTA, LEONARD GEORGE;
ZHANG, FEN y
BALIGA, RAMESH**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 717 704 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

Cadena J modificada

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos de cadena J recombinantes modificados y moléculas de unión, tales como anticuerpos que los comprenden.

Antecedentes de la invención

La cadena J es un polipéptido ácido de 15 kDa, que se asocia con IgM pentamérica e IgA dimérica a través de enlaces disulfuro que involucran el penúltimo residuo de cisteína en la pieza de cola secretora de 18 aminoácidos (tp) en el extremo C de la IgM μ o una cadena pesada IgA α . Los tres enlaces disulfuro se forman entre Cys 12 y 100, Cys 71 y 91, y Cys 108 y 133, respectivamente. Ver, por ejemplo, Frutiger et al. 1992, *Biochemistry* 31, 12643-12647. Los requisitos estructurales para la incorporación de la cadena J en la IgM e IgA humana y para el ensamblaje de inmunoglobulina polimérica y la asociación con la cadena J se informan en Sorensen et al. 2000, *Int. Immunol.* 12 (1): 19-27 y en Yoo et al. 1999, *J. Biol. Chem.* 274 (47): 33771-33777, respectivamente. La producción recombinante de cadena J soluble en E. coli se informa en Redwan et al. 2006, *Human Antibodies* 15: 95-102.

15 Los métodos para producir anticuerpos híbridos IgA/IgG e IgM/IgG son conocidos en la técnica. Por lo tanto, la producción recombinante de anticuerpos híbridos IgA2/IgG1 se informa en Chintalacharuvu et al. 2001, *Clin Immunol* 101 (1): 21-31. Se ha informado que la adición de ctp o μ tp al final de la cadena pesada de IgG y facilita la polymerización y aumenta la función efectora, como la activación del complemento (Smith et al., *J Immunol* 1995, 154: 2226-2236). Los anticuerpos híbridos IgA/IgG poseen propiedades tanto de IgA como de IgG.

20 A pesar de los avances realizados en el diseño de anticuerpos, sigue existiendo la necesidad de anticuerpos modificados con propiedades mejoradas, tales como afinidad, especificidad y/o avidad mejoradas.

A medida que la disciplina ha progresado, la función de los anticuerpos se mejoró a través de medios creativos de ingeniería de proteínas, como para proporcionar mayor afinidad, mayor vida media y/o mejor distribución tisular, así como combinación de tecnologías de molécula pequeña y grande para un mayor enfoque de la destrucción celular a través de la administración de cargas tóxicas (por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco). Otro enfoque para mejorar la función del anticuerpo aprovecha la unión bivalente de la estructura de la inmunoglobulina G (IgG) que permite que una molécula de IgG se une a dos antígenos. De hecho, en ciertas aplicaciones, existe un buen potencial para que los anticuerpos asimétricos ejerzan funciones útiles al unir simultáneamente dos antígenos diana diferentes. Para abordar esta necesidad, se han producido una variedad de construcciones para producir una única molécula que puede unirse a dos antígenos diferentes, lo que permite funciones nunca antes vistas en la naturaleza. Un ejemplo de este enfoque biespecífico es el "blinatumomab" (MT103 o AMG103) que se une a los receptores CD3 y CD 19, en los linfocitos T y B, respectivamente. Este anclaje de un linfocito T citotóxico a un linfocito B cancerosa permite un tratamiento efectivo de la leucemia de linfocitos B.

35 Sin embargo, siguen existiendo dificultades técnicas importantes en la construcción, expresión y producción de anticuerpos biespecíficos. Aunque los anticuerpos biespecíficos se consideran agentes terapéuticos prometedores debido a su capacidad para unirse simultáneamente a dos antígenos diferentes, su utilidad está limitada debido a problemas de estabilidad y complejidad de fabricación.

40 Se han utilizado varias formas de ingeniería de proteínas para hacer coincidir cadenas pesadas heterólogas, además de una adecuada combinación por pares de cadenas pesadas y ligeras para producir eficientemente una IgG biespecífica. Además, varios formatos de anticuerpos biespecíficos, que incluyen cuadromas, heteroconjugados químicos, construcciones recombinantes que utilizan dominios de heterodimerización seleccionados y construcciones recombinantes de tamaño mínimo que consta de dos sitios de unión a antígeno mínimos.

45 Sin embargo, todos estos esfuerzos han estado llenos de dificultades.

Por lo tanto, a pesar de los esfuerzos dirigidos hacia el desarrollo de anticuerpos de ingeniería, como los anticuerpos biespecíficos, sigue existiendo una gran necesidad de desarrollar plataformas más eficientes. Esto es particularmente cierto en el caso de los anticuerpos terapéuticos, donde el diseño y la producción de nuevos anticuerpos modificados y moléculas similares a anticuerpos con múltiples especificidades pueden reducir el tiempo entre el descubrimiento y la introducción clínica de dichas terapias.

Compendio de la invención

50 La presente invención se basa, al menos en parte, en el reconocimiento de que la cadena J de un anticuerpo IgM o IgA puede modificarse introduciendo uno o más restos de unión en una secuencia de cadena J nativa, y la cadena J modificada puede introducirse en los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA sin comprometer la funcionalidad del anticuerpo receptor o la unión de la cadena J modificada a su objetivo. Esto permite que la cadena J modificada con el grupo funcional de unión interactúe con un conjunto de antígenos diana, mientras que el anticuerpo IgA, IgM, IgG/IgM o IgG/IgA puede reaccionar con un conjunto diferente de antígenos diana.

La invención se basa además en el reconocimiento de que al dirigir la cadena J modificada a una célula efectora, como un linfocito T, un linfocito citolítico natural, un macrófago o un neutrófilo, se puede activar la respuesta inmune del cuerpo y el anticuerpo depende La respuesta de la citotoxicidad celular (ADCC) se puede mejorar.

- 5 La invención proporciona un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA, como se define en las reivindicaciones, que comprende una cadena J modificada, en la que la cadena J modificada comprende un grupo funcional de unión extraño introducido en una cadena J de secuencia nativa.
- En una realización, la cadena J de secuencia nativa es la secuencia de la cadena J humana nativa de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento funcional de la misma.
- 10 En otra realización, el grupo funcional de unión extraño se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa de la SEQ ID NO: 1 mediante fusión directa o indirecta.
- En otra realización más, el grupo funcional de unión se introduce mediante fusión indirecta a través de un enlazador peptídico.
- En una realización, la fusión indirecta se lleva a cabo a través de un enlazador peptídico en o alrededor del extremo C y/o N del grupo funcional de unión.
- 15 En otra realización, el grupo funcional de unión extraña se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa de la SEQ ID NO: 1 en o alrededor del extremo C y/o el extremo N, tal como dentro de aproximadamente 10 residuos del extremo C y/o el N-terminal.
- En una realización adicional, el grupo funcional de unión extraño se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa entre los residuos de cisteína 92 y 101 de la SEQ ID NO: 1.
- 20 En una realización adicional más, el grupo funcional de unión extraño se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa de la SEQ ID NO: 1 en o cerca de un sitio de glicosilación.
- El enlace peptídico, si está presente, puede tener, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 10 a 20 aminoácidos, o una longitud de aproximadamente 15 a 20 aminoácidos, o una longitud de 15 aminoácidos.
- 25 En una realización adicional, el grupo funcional de unión extraño se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa de la SEQ ID NO: 1 mediante derivatización química o quimio-enzimática. El enlazador químico puede ser un enlazador escindible o no escindible, en el que el enlazador escindible puede ser, por ejemplo, un enlazador químicamente lóbil o un enlazador enzimático.
- 30 En una realización adicional, el enlazador se selecciona del grupo que consiste en propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), pentanoato de N-succinimidil-4-(2-piridiltio) (SPP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres, ésteres activos, aldehídos, compuestos bis-azido, derivados de bis-diazonio, diisocianatos y compuestos de flúor activos.
- En una realización diferente, la cadena J se modifica mediante la inserción de un sitio de reconocimiento enzimático, y uniendo después de la traducción un grupo funcional de unión extraña al sitio de reconocimiento enzimático a través de un enlazador peptídico o no peptídico.
- 35 En todas las realizaciones, el grupo funcional de unión extraña puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, conjugados de anticuerpo-fármaco, moléculas de tipo anticuerpo, fragmentos de unión a antígeno de moléculas de tipo anticuerpo, soluble y proteínas unidas a la membrana, ligandos, receptores, partículas similares a virus, toxinas proteicas, enzimas y estructuras alternativas. Ejemplos de estructuras alternativas incluyen dorfinas, dominios de fibronectina, adnectinas y nudillos.
- 40 Los fragmentos de unión a antígeno típicos incluyen F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv y anticuerpos de dominio único. En una realización preferida, el fragmento de unión a antígeno es scFv.
- En una realización, el grupo funcional de unión extraña de la cadena J modificada se une a una célula efectora, donde la célula efectora puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos y neutrófilos.
- 45 En una realización, la célula efectora es un linfocito T, donde el grupo funcional de unión extraña puede, por ejemplo, unirse a CD3ε en el linfocito T.
- En otra realización, la célula efectora es un linfocito citolítico natural, donde la diana para el grupo funcional de unión extraña de la cadena J modificada puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en CD16, CD64 y NKG2D en el linfocito citolítico natural.
- 50 En otra realización más, la célula efectora es un macrófago, en el que el grupo funcional de unión extraño de la cadena J modificada puede, por ejemplo, unirse a CD14 en el macrófago.

En una realización adicional, la célula efectora es un neutrófilo, donde el grupo funcional de unión extraña de la cadena J modificada puede, por ejemplo, unirse a CD16b o CD177 en el neutrófilo.

Como se establece anteriormente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA, e incluye multiespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos.

- 5 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgM, un anticuerpo IgA, o un anticuerpo IgG que comprende una pieza de cola, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En otra realización, el anticuerpo tiene especificidad de unión a una o más dianas de unión seleccionadas del grupo que consiste en células diana, dianas de unión solubles, receptores de superficie celular, proteínas de la matriz, receptores transportadores.

- 10 En otra realización más, el anticuerpo se une a una célula tumoral.

En una realización adicional, el anticuerpo se une a un antígeno asociado a la diana del tumor listado en la figura 19, donde la cadena J puede, por ejemplo, modificarse para unirse a cualquiera de las dianas de células efectoras enumeradas en la figura 19.

- 15 En otras realizaciones adicionales, la cadena J modificada está presente en los anticuerpos en una orientación V-Enlazador-J o en una orientación J-Enlazador-V.

En una realización, el tumor es un cáncer hematológico o un tumor sólido, donde el cáncer hematológico puede ser, por ejemplo, leucemia, linfoma, mieloma y síndrome mielodisplásico, incluyendo específicamente leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena crónica o Leucemia linfocítica crónica, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin. En tales realizaciones, el anticuerpo puede, por ejemplo, unirse a uno o más de CD11, CD19, CD20, CD22, CD33, CD70, CD56, CD138, y la cadena J modificada puede unirse a CD3ε.

En otra realización, el tumor es un tumor epitelial.

En otra realización más, el anticuerpo se une a una diana basada en carbohidratos en el tumor.

En una realización adicional, el anticuerpo se une a un antígeno viral, tal como un antígeno del VHB o un antígeno del VIH, por ejemplo. PreS1 o GP120.

- 25 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM, IgG/IgA de la invención, como se describe en las reivindicaciones. La composición puede ser, por ejemplo, una composición farmacéutica o una composición de diagnóstico.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para tratar un tumor o enfermedad viral que comprende administrar a un sujeto que necesita una cantidad eficaz de un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM, IgG/IgA con una cadena J modificada, como se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM, IgG/IgA con una cadena J modificada, como se describe en el presente documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor o enfermedad viral.

- 35 En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM, IgG/IgA con una cadena J modificada, como se describe en el presente documento en el tratamiento de un tumor o enfermedad viral.

La invención proporciona además los anticuerpos y composiciones de la invención, para el uso como se define en las reivindicaciones.

Descripción breve de los dibujos

- 40 La figura 1 ilustra la estructura de un pentámero IgM, que comprende una cadena J, en la que las cadenas A y B son idénticas en IgM nativa.

La figura 2 muestra las estructuras esquemáticas de IgA, IgA dimérica e IgA secretora (slgA).

La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena J humana madura (SEQ ID NO: 1).

La figura 4 muestra la alineación de la cadena J humana madura (SEQ ID NO: 1) y las cadenas J de varias especies animales (SEQ ID Nos: 1 a 44).

- 45 Hum = Humano NP 653247 23-159 (SEQ ID NO: 1)

Chm = Chimpancé XP 001160135 39-175 (SEQ ID NO: 2)

Gor = Gorila XP 004038830 23-159 (SEQ ID NO: 3)

- Ora = Orangután NP 001125381 23-159 (SEQ ID NO: 4)
- Gib = Gibón XP 003265761 39-175 (SEQ ID NO: 5)
- Mar = Mono tití XP_003732538 32-168 (SEQ ID NO: 6)
- Cyn = Mono cinomolgo NP_001247815 23-159 (SEQ ID NO: 7)
- 5 Bab = Babuino XP 003898844 23-159 (SEQ ID NO: 8)
- Squ = Mono ardilla XP 003931978 23-159 (SEQ ID NO: 9)
- Shr = Musaraña XP 006142955 25-160 (SEQ ID NO: 10)
- Dol = Delfín XP 004328961 25-158 (SEQ ID NO: 11)
- Kil = Ballena asesina XP 004283629 25-158 (SEQ ID NO: 12)
- 10 Ele = Elefante XP 003414110 25-158 (SEQ ID NO: 13)
- Sea = Foca XP_006729388 25-158 (SEQ ID NO: 14)
- Rhi = Rinoceronte XP 004419202 25-157 (SEQ ID NO: 15)
- Cat = Gato doméstico XP 003985350 25-158 (SEQ ID NO: 16)
- Wol = Lobo XP 532398 26-159 (SEQ ID NO: 17)
- 15 Pan = Panda gigante EFB23253 1-134 (SEQ ID NO: 18)
- Fer = Hurón XP 004766376 26-158 (SEQ ID NO: 19)
- Hor = Caballo NP 001271464 25-158 (SEQ ID NO: 20)
- Gui = Conejillo de Indias NP 001265705 25-160 (SEQ ID NO: 21)
- Cam = Camello XP_006188738 25-158 (SEQ ID NO: 22)
- 20 Goa = Cabra XP 005681786 25-158 (SEQ ID NO: 23)
- Chn = Chinchilla XP 005392838 94-229 (SEQ ID NO: 24)
- Ham = Hámster XP 005068228 24-160 (SEQ ID NO: 25)
- She = Oveja XP 004009937 25-158 (SEQ ID NO: 26)
- BBa = Murciélagos marrón XP 006094475 25-158 (SEQ ID NO: 27)
- 25 Ant = Antílope XP 005983836 25-158 (SEQ ID NO: 28)
- Cow = Vaca NP 786967 25-157 (SEQ ID NO: 29)
- Mou = Ratón NP 690052 23-159 (SEQ ID NO: 30)
- Rat = Rata EDL88516 23-159 (SEQ ID NO: 31)
- Hed = Erizo XP 004703237 25-157 (SEQ ID NO: 32)
- 30 Rab = Conejo P23108 1-136 (SEQ ID NO: 33)
- Opo = Zarigüeya XP 003341415 29-162 (SEQ ID NO: 34)
- All = Caimán XP 006270094 26-159 (SEQ ID NO: 35)
- Tur = Tortuga XP 005304167 26-159 (SEQ ID NO: 36)
- Tas = Demonio de Tasmania XP 003772863 27-160 (SEQ ID NO: 37)
- 35 Pla = Ornitorrinco XP 003430954 36-160 (SEQ ID NO: 38)
- Par = Perico XP 005142787 28-160 (SEQ ID NO: 39)
- Duc = Pato XP 005031370 28-160 (SEQ ID NO: 40)

Chi = Gallina NP 989594 26-158 (SEQ ID NO: 41)

Tur = Pavo XP 003205717 27-159 (SEQ ID NO: 42)

Fal = Halcón XP 005243236 29-160 (SEQ ID NO: 43)

Spa = Gorrión XP 005492217 29-158 (SEQ ID NO: 44)

- 5 La figura 5 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de la cadena J de humano y murciélagos (zorro volador negro, *Pteropus alecto*) (SEQ ID NO: 1 y 45, respectivamente).

La figura 6: Un anticuerpo IgM que carece de su cadena J (control negativo) e IgM que comprende una cadena J se separaron al reducir la SDS PAGE y se detectaron mediante transferencia de Western usando un anticuerpo anti-J. El anticuerpo anti-cadena J solo reaccionó con la IgM que comprende una cadena J.

- 10 La figura 7: El sobrenadante recolectado de células CHO transfectadas se dividió por igual para inmunoprecipitación con matriz de afinidad anti-mu o anti-myc. Estas células CHO expresaban una IgM con especificidad de células anti-B conocida como CDIM (para la molécula inductora de muerte celular). Este anticuerpo IgM se conoce como IGM-55.5. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron al reducir la SDS PAGE y se detectaron mediante transferencia de Western mediante anticuerpos anti-J o anti-myc. Tanto los linfocitos Transfectados anti-CD3scFvJ etiquetadas en el extremo N-terminal, como las células J-antiCD3scFvJ etiquetadas en el terminal C mostraron una banda positiva de alrededor de 51 kD, que reaccionó a los anticuerpos anti-J y anti-myc.

La figura 8 ilustra dos orientaciones diferentes de un pentámero IgM bis-específico que comprende una cadena J modificada con especificidad de unión para un linfocito T (el antígeno de linfocitos T CD3).

- 20 La figura 9: Secuencia (SEQ ID NO: 46) y estructura de un Fv monocatenario anti-CD3 que comprende una cadena J en el extremo C-terminal (antiCD3scFv-J). SP = péptido señal.

La figura 10: Secuencia (SEQ ID NO: 47) y estructura de un Fv monocatenario anti-CD3 que comprende una cadena J en el extremo N (J-antiCD3scFv). SP = péptido señal.

- 25 La figura 11 es una ilustración esquemática de un pentámero IgM biespecífica asimétrico con especificidad de unión para un antígeno diana, que comprende un dominio de unión unido covalentemente a la cadena J con especificidad de unión para una célula efectora.

La figura 12 muestra transferencias de Western de un pentámero IgM anti-CD20 con una cadena J modificada covalentemente con un dominio de unión a scFv de CD3. La PAGE no reductora con tinción azul de Coomassie observa el tamaño completo de la IgM: aproximadamente 1 millón de daltons MW. La cadena J modificada se incorpora en los pentámeros IgM en ambas orientaciones: CD3-J y J-CD3.

- 30 La figura 13 muestra los resultados de las cotransfecciones transitorias de la cadena pesada (HC), la cadena ligera (LC) y la cadena J modificada de una IgM anti-CD20 biespecífica (CD20_{IgM}) con una cadena J modificada que proporciona especificidad de unión a CD3 (CD3_J).

- 35 La figura 14 muestra que la incorporación de una cadena J modificada en una IgM anti-CD20 no tiene ningún efecto negativo sobre la actividad de los CDC. Además, los datos muestran que una molécula de IgM que comprende una cadena J modificada en cualquier orientación (V15J o J15V, donde "15" designa la longitud del conector) es significativamente más potente que un anticuerpo IgG anti-CD20.

- 40 La figura 15 muestra que una molécula biespecífica CD20_{IgM} x CD3_{cadena-J} es altamente potente en el agotamiento de los linfocitos B como resultado de la destrucción activa de linfocitos B de linfocitos T debido a la especificidad de CD3 de la cadena J modificada. Raji, una línea de células CD19 + CD20 + B, se co-cultivó con T-ALL, una línea de linfocitos T citolíticas CD8 + con CD20 IgM x J de tipo salvaje o CD20 IgM x CD3-J durante 24 horas a 37 grados, CO₂ al 5%. Las células se recogieron y se sometieron a tinción con anticuerpos fluorescentes para CD3 y CD 19 y se analizaron por citometría de flujo para evaluar los linfocitos B viables.

- 45 La figura 16 muestra que una molécula biespecífica de IgM anti-CD20 con una cadena J modificada que proporciona especificidad de unión a CD3 ha mejorado significativamente la actividad citotóxica sobre un pentámero de IgM anti-CD20 con cadena J de tipo salvaje. El pentámero de IgM biespecífica que actúa sobre los linfocitos T es efectivo a una concentración de 1 ng/ml, y es 300 veces más potente en comparación con la IgM anti-CD20 con la cadena J de tipo salvaje.

- 50 La figura 17 muestra la reducción de linfocitos B in vivo con IgG anti-CD20, IgM e IgM biespecífica. Se obtuvieron ratones NSG humanizados reconstituidos con células madre CD34 + humanas (Jackson Laboratory; Stock Number: 007799) y se analizó la sangre completamente para determinar los niveles de dosis previas de linfocitos B CD19+. La cadena CD20 IgM x CD3-J se preparó para la dosificación intravenosa de animales a 0,5 mg/kg. Después de 6 horas después de la dosificación, se obtuvo sangre completa de animales y se analizó mediante citometría de flujo

para determinar los niveles circulantes de linfocitos B humanas utilizando un anticuerpo CD19+ marcado con fluorescencia.

La figura 18 es una transferencia Western de un CD 16 de cadena J camélida Vhh específica.

La figura 19 enumera dianas de anticuerpos IgM y dianas de células efectoras para una cadena J modificada.

5 Cualquiera de los objetivos de anticuerpos IgM enumerados en la columna izquierda de la tabla se puede combinar con cualquiera de los objetivos de cadena J modificadas enumerados en la columna derecha.

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

10 Antes de que la presente invención se describa con mayor detalle, debe entenderse que esta invención no está limitada a realizaciones particulares descritas, ya que tales pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

15 Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor interpolado, a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor declarado o interpolado en el rango indicado está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños abarcados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido.

20 A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comprende comúnmente un entendido en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994), proporciona a un entendido en la materia una guía general de muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

25 El término "anticuerpo" comprende anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), moléculas de cadena única, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv). El término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza indistintamente con "anticuerpo" en el presente documento. La unidad básica de anticuerpos de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. A menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio e incluye específicamente todos los isotipos, subclases y formas de anticuerpos, incluidos los anticuerpos IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y sus fragmentos, preferiblemente la unión a antígeno fragmentos Los anticuerpos preferidos en este documento incluyen anticuerpos IgM e IgA y sus fragmentos de unión a antígeno, que pueden modificarse para incluir secuencias de otros isotipos, tales como IgG para producir anticuerpos químéricos.

30 35 En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas generalmente es de aproximadamente 150.000 daltones. Cada cadena L está unida a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene enlaces disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas a y y y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante en su otro extremo. El V_L está alineado con el VH y el CL está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H). Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L juntos forman un solo sitio de unión a antígeno.

40 45 50 La IgM es una glicoproteína que forma polímeros en los que múltiples inmunoglobulinas se unen covalentemente con enlaces disulfida. La IgM existe principalmente como pentámero, pero también como hexámero y, por lo tanto, contiene 10 o 12 sitios de unión a antígeno. La forma pentamérica típicamente contiene un polipéptido adicional, llamado la cadena J, pero también se puede hacer en ausencia de la cadena J. La molécula de IgM pentamérica tiene un peso molecular de aproximadamente 970 kDa. Debido a su naturaleza polimérica, la IgM posee una gran avidez y es particularmente eficaz en la activación del complemento. A diferencia de la IgG, la cadena pesada en los monómeros de IgM se compone de una variable y cuatro dominios constantes. Los dominios constantes de IgM se designan aquí como CM1 o $C\mu$ 1, CM2 o $C\mu$ 2, CM3 o $C\mu$ 3, y CM4 o $C\mu$ 4, en donde las designaciones "CM" y $C\mu$ "se usan indistintamente. La estructura de un pentámero IgM se ilustra en la figura 1.

55 El término "IgM" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio e incluye específicamente moléculas de IgM monoespecíficas y multiespecíficas (incluidas las biespecíficas), como, por ejemplo, las moléculas de unión de IgM multiespecíficas descritas en la solicitud PCT No. PCT/US2014/054079.

El término "unidad de unión a IgM" o "unidad de unión a anticuerpo IgM" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente un polipéptido de región constante de cadena pesada de anticuerpo IgM, que comprende al menos

un dominio constante CM4, fusionado a una unión de secuencia de dominio variable (V_H) a un objetivo (por ejemplo, antígeno), con o sin una secuencia de dominio de cadena variable (V_L) de anticuerpo asociado.

El término "unidad de unión a IgM biespecífica" o "unidad de unión a anticuerpo IgM biespecífico" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente un par de polipéptidos de región constante de cadena pesada de anticuerpo IgM, que comprenden al menos un dominio constante CM4, fusionado a una secuencia de dominio variable (V_H), cada secuencia de dominio variable se une a un objetivo diferente, con o sin secuencias de dominio de cadena variable (V_L) de anticuerpo asociado. En una realización, el anticuerpo IgM biespecífica comprende dos regiones de unión a antígeno V_HV_L , cada una capaz de unirse a un epítope diferente en un antígeno o epítopes en dos antígenos diferentes. Las unidades de unión al anticuerpo IgM biespecífica pueden ser de longitud completa de una sola especie, o ser quimerizadas o humanizadas. Los anticuerpos IgM biespecíficos de la presente invención tienen una estructura de anillo penta o hexamérico que comprende cinco o seis unidades de unión a IgM biespecíficas.

El término "IgM multiespecífica" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio para referirse a anticuerpos IgM con dos o más especificidades de unión. Por lo tanto, el término "multiespecífico" incluye "biespecífico", p. Ej. Anticuerpos biespecíficos o unidades de unión biespecíficas, incluidos los pentámeros IgM que comprenden al menos dos subunidades monoespecíficas, cada una de ellas unida a un antígeno diferente (AA, BB), o cinco o seis subunidades biespecíficas, cada una de ellas unida a dos antígenos diferentes (AB, AB). Por lo tanto, los pentámeros IgM biespecíficos y multiespecíficos pueden incluir cinco unidades de unión biespecíficas idénticas, unidades de unión de IgM monoespecíficas, al menos dos de ellas tienen diferentes especificidades de enlaces, o cualquier combinación de los mismos.

Una "cadena pesada de anticuerpo IgM de longitud completa" es un polipéptido que consiste en la dirección N-terminal a C-terminal de un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante de cadena pesada constante de anticuerpo 1 (CM1 o $C\mu 1$), un anticuerpo pesado dominio constante de cadena 2 (CM2 o $C\mu 2$), un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 3 (CM3 o $C\mu 3$), y un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 4 (CM4 o $C\mu 4$). Los anticuerpos IgM de longitud completa biespecíficos como se definen en el presente documento comprenden cinco o seis monómeros (unidades de unión), cada uno con dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente a dos dianas de unión diferentes (epítopos). El término C de la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa denota el último aminoácido en el término C de la cadena pesada o ligera. El extremo N de la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa denota el primer aminoácido en el extremo N de la cadena pesada o ligera.

La IgA nativa es una proteína tetramérica que comprende dos cadenas ligeras idénticas (κ o λ) y dos cadenas pesadas idénticas (α). En el ser humano, hay dos isotipos de IgA, IgA1 e IgA2. IgA, al igual que IgG, contiene tres dominios constantes (CA1-CA3 o $C\alpha 1-C\alpha 3$), con una región bisagra entre los dominios $C\alpha 1$ y $C\alpha 2$, en donde las designaciones "CA" y " $C\alpha$ " se usan indistintamente. Todos los isotipos de IgA tienen una "pieza de cola" de 18 aminoácidos, que se encuentra en el extremo C al dominio $C\alpha 3$, que permite la formación de Ig polimérica (ver, por ejemplo, Garcia-Pardo y otros, 1981, *J. Biol. Chem.* 256, 11734-11738 y Davis et al, 1988, *Eur. J. Immunol.* 18, 1001- 1008). La IgA sérica es un monómero, pero también puede polimerizar. En su forma secretora, IgA comprende de 2 a 5 unidades básicas de 4 cadenas, unidas por una cadena J, que pueden incluir una pieza de cola y pueden estar asociadas por un componente secretor. Las estructuras de la pieza de cola, la IgA dimérica y la IgA secretora, asociadas con un componente secretor (slgA) se ilustran en la figura 2. Los anticuerpos IgA se pueden dividir en subclases IgA1 e IgA2. El término "anticuerpo IgA" se utiliza en el presente documento para incluir específicamente todas las subclases, es decir, Los anticuerpos IgA1 e IgA2, incluidas las formas diméricas y multiméricas, con y sin un componente secretor, así como los fragmentos, preferiblemente fragmentos de unión a antígeno, de dichos anticuerpos. Para los propósitos de la presente invención, el anticuerpo IgA es preferiblemente un dímero, donde dos piezas de la cola están conectadas por una cadena J (ver, Figura 2).

El término "IgA" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio e incluye específicamente moléculas de IgA monoespecíficas y multiespecíficas, tales como, por ejemplo, las moléculas de unión a IgA multiespecíficas que se describen en la solicitud PCT No. PCT/US2015/015268.

El término "IgA multiespecífica" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio para referirse a anticuerpos IgA con dos o más especificidades de unión. Por lo tanto, el término "multiespecífico" incluye "biespecífico", p. Ej. Anticuerpos biespecíficos o unidades de unión biespecíficas, incluidos los dímeros de IgA que comprenden dos subunidades monoespecíficas, cada una de ellas se une a un antígeno diferente (AA, BB), o dos subunidades biespecíficas, cada una de ellas se une a dos antígenos diferentes (AB, AB).

En una realización, las moléculas de IgA multiespecíficas diméricas consisten en dos unidades de unión monoespecíficas, teniendo cada unidad de unión una especificidad de unión a un objetivo de unión diferente (AA, BB). En otra realización, en las moléculas de IgA dímeras, al menos una de las dos unidades de unión tiene dos especificidades de unión diferentes (es decir, es biespecífica, por ejemplo, AA, A, B o AA, BC). En otra realización, cada una de las dos unidades de enlace tiene dos especificidades, que pueden ser iguales (AB, AB) o diferentes (AC, CD o AB, AC, por ejemplo).

- El término "unidad de unión a anticuerpo IgA biespecífico" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente un par de polipéptidos de región constante de cadena pesada de anticuerpo IgA, que comprenden al menos un dominio constante CA3, fusionado a una secuencia de dominio variable (V_H), cada dominio variable unión de secuencia a un objetivo diferente, con o sin secuencias de dominio de cadena variable (V_L) de anticuerpo 5 asociado. En una realización, el anticuerpo IgA biespecífico comprende dos regiones de unión a antígeno V_HV_L , cada una capaz de unirse a un epítope diferente en un antígeno o epítopes en dos antígenos diferentes. Las unidades de unión al anticuerpo biespecífico IgA pueden ser de longitud completa de una sola especie, o ser quimerizadas o humanizadas.
- Una "cadena pesada de anticuerpo IgA de longitud completa" es un polipéptido que consiste en la dirección N-terminal a C-terminal de un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, una constante de anticuerpo de dominio de cadena pesada 1 (CA1 o $C\alpha_1$), una constante de anticuerpo dominio constante de cadena pesada 2 (CA2 o $C\alpha_2$), y un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 3 (CA3 o $C\alpha_3$). Los anticuerpos de IgA de longitud completa bi o multiespecíficos de acuerdo con la invención comprenden dos monómeros (unidades de unión), cada uno de los cuales puede ser mono o biespecífico, con o sin un componente secretor. Por lo tanto, los 10 anticuerpos IgA multiespecíficos de la presente invención pueden incluir unidades de unión monoespecíficas y biespecíficas, siempre que el anticuerpo IgA resultante tenga al menos dos especificidades de unión. El término C de la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa denota el último aminoácido en el término C de la cadena pesada o ligera. El extremo N de la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa denota el 15 primer aminoácido en el extremo N de la cadena pesada o ligera.
- Para más detalles sobre la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, ver, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8^a edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, página 71 y Capítulo 6.
- El término "interfaz", como se utiliza en el presente documento, se utiliza para referirse a una región, que comprende aquellos aminoácidos de "contacto" (u otros grupos que no son aminoácidos, como, por ejemplo, grupos de carbohidratos) en una primera región constante de cadena pesada de IgM que interactúa con uno o más residuos de aminoácidos de "contacto" (u otros grupos que no son aminoácidos) en una segunda región constante de cadena pesada de IgM.
- El término "interfaz asimétrica" se utiliza para referirse a una interfaz (como se define aquí anteriormente) formada entre dos cadenas de anticuerpos, como una primera y una segunda región constante de la cadena pesada de IgM y/o entre una región constante de la cadena pesada de IgM y correspondiente cadena liviana, en la que los residuos de contacto en la primera y la segunda cadenas son diferentes por diseño, que comprenden residuos de contacto complementarios. La interfaz asimétrica se puede crear por medio de interacciones cavidades/agujeros y/o enlaces salinos (intercambios de carga) y/u otras técnicas conocidas en la técnica, como, por ejemplo, el enfoque CrossMab para acoplar una cadena pesada a su correspondiente cadena liviana.
- Una "cavidad" o "agujero" se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácido que está rebajada de la interfaz del segundo polipéptido y, por lo tanto, aloja una protuberancia correspondiente ("botón") en la interfaz adyacente del primer polipéptido. La cavidad (orificio) puede existir en la interfaz original o puede introducirse sintéticamente (por ejemplo, alterando el ácido nucleico que codifica la interfaz). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la interfaz del segundo polipéptido se altera para codificar la cavidad. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al 30 menos un residuo de aminoácido "original" en la interfaz del segundo polipéptido se reemplaza con el ADN que codifica al menos un residuo de aminoácido "importante" que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el aminoácido original. residuo. Se apreciará que puede haber más de un residuo de importación original y correspondiente. El límite superior para el número de residuos originales que se reemplazan es el número total de residuos en la interfaz del segundo polipéptido. Los residuos de importación preferidos para la formación de una cavidad son generalmente residuos de aminoácidos naturales y se seleccionan preferiblemente de alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V) y glicina (G). Los residuos de aminoácidos más preferidos son serina, alanina o treonina, más preferiblemente alanina. En la realización preferida, el residuo original para la formación de la protuberancia tiene un gran volumen de cadena lateral, tal como tirosina (Y), arginina (R), fenilalanina (F) o triptófano (W).
- Un residuo de aminoácido "original" es uno que se reemplaza por un residuo de "importación" que puede tener un volumen de cadena lateral mayor o menor que el residuo original. El residuo de aminoácido de importación puede ser un residuo de aminoácido natural o no natural, pero preferiblemente es el primero.
- Por "aminoácido de origen no natural" se entiende un residuo que no está codificado por el código genético, pero que es capaz de unir covalentemente los residuos de aminoácidos adyacentes en la cadena polipeptídica. Ejemplos 55 de residuos de aminoácidos no naturales son norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuos de aminoácidos tales como los descritos en Ellman et al, Meth. Enzym. 202: 301-336 (1991), por ejemplo. Para generar dichos residuos de aminoácidos no naturales, los procedimientos de Noren et al. Science 244: 182 (1989) y Ellman et al, supra pueden utilizarse. Brevemente, esto implica activar químicamente un ARNt supresor con un residuo de aminoácido no natural seguido de una transcripción y traducción *in vitro* del ARN. Los métodos de la 60 presente invención, en ciertas realizaciones, implican reemplazar al menos un residuo de aminoácido original en una

cadena pesada de IgM, pero se puede reemplazar más de un residuo original. Normalmente, no más que los residuos totales en la interfaz del primer o segundo polipéptido comprenderán residuos de aminoácidos originales que se reemplazan. Los residuos originales preferidos para reemplazo son "enterrados". Por "enterrado" se entiende que el residuo es esencialmente inaccesible para el disolvente. El residuo de importación preferido no es la cisteína para evitar la posible oxidación o el emparejamiento incorrecto de los enlaces disulfuro.

La protuberancia es "posicionable" en la cavidad, lo que significa que la ubicación espacial de la protuberancia y la cavidad en la interfaz del primer polipéptido y el segundo polipéptido respectivamente y los tamaños de la protuberancia y la cavidad son tales que la protuberancia puede ubicarse en la cavidad sin perturbar significativamente la asociación normal de los polipéptidos primero y segundo en la interfaz. Dado que las

10 protuberancias como Tyr, Phe y Trp no se extienden típicamente perpendicularmente desde el eje de la interfaz y tienen conformaciones preferidas, la alineación de una protuberancia con una cavidad correspondiente se basa en el modelado del par de protuberancia/cavidad basado en una estructura tridimensional tal como la obtenida por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Esto se puede lograr usando técnicas ampliamente aceptadas en la técnica, incluyendo técnicas de modelado molecular.

15 Por "ácido nucleico original" se entiende el ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés que puede ser "alterado" (es decir, modificado genéticamente o mutado) para codificar una protuberancia o cavidad. El ácido nucleico original o de partida puede ser un ácido nucleico natural o puede comprender un ácido nucleico que se haya sometido a una alteración previa (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo humanizado). Por "alterar" el ácido nucleico se entiende que el ácido nucleico original se muta al insertar, eliminar o reemplazar al menos un codón que

20 codifica un residuo de aminoácido de interés. Normalmente, un codón que codifica un residuo original se reemplaza por un codón que codifica un residuo de importación. Las técnicas para modificar genéticamente un ADN de esta manera se han revisado en Mutagénesis: un enfoque práctico, MJ McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, Reino Unido (1991), e incluyen mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis en casete y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mutagénesis, por ejemplo.

25 La protuberancia o cavidad se puede "introducir" en la interfaz del primer o segundo polipéptido por medios sintéticos, p. Ej. por técnicas recombinantes, síntesis de péptidos in vitro, aquellas técnicas para la introducción de residuos de aminoácidos no naturales descritos previamente, por acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas. De acuerdo con esto, la protuberancia o cavidad que se "introduce" es "no natural" o "no nativa", lo que significa que no existe en la naturaleza o en el polipéptido original (por ejemplo, un

30 anticuerpo monoclonal humanizado).

Preferiblemente, el residuo de aminoácido de importación para formar la protuberancia tiene un número relativamente pequeño de "rotámeros" (por ejemplo, aproximadamente 3-6). Un "rotámero" es una conformación energéticamente favorable de una cadena lateral de aminoácidos. El número de rotámeros para los diversos residuos de aminoácidos se revisa en Ponders y Richards, J. Mol. Biol. 193: 775-791 (1987).

35 A menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo" incluye específicamente los anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD e IgM nativos humanos y no humanos, incluidas las variantes naturales. Así, por ejemplo, la secuencia de IgM humana está disponible bajo el Número de Acceso de GenBank X14940.1, mientras que las variantes se han reportado como GenBank CAB37838.1, CAC20458.1, AFM37312.1, X57331.1 y J00260.1.

40 El término "nativo" con referencia a un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o una cadena J) se utiliza en el presente documento para referirse a un polipéptido que tiene una secuencia que ocurre en la naturaleza, independientemente de su modo de preparación. Por lo tanto, los términos "nativo" y "secuencia nativa" se usan aquí de manera intercambiable, y abarcan expresamente los polipéptidos recombinantes con una secuencia que se encuentra en la naturaleza.

45 El término "cadena J de secuencia nativa" o "cadena J nativa", como se utiliza aquí, se refiere a la cadena J de los anticuerpos IgM o IgA de secuencia nativa de cualquier especie animal, incluida la cadena J humana madura, cuya secuencia de aminoácidos es mostrado en la fig. 3 (SEQ ID NO: 1) y las cadenas J de especies animales no humanas, que incluyen, sin limitación, los polipéptidos de cadena J de secuencia nativa de las SEQ ID NO: 2 a 44 mostradas en la figura 4 o el polipéptido de la cadena J de murciélagos (SEQ ID NO: 45) mostrado en la figura 5.

50 El término "cadena J modificada" se utiliza en el presente documento para referirse a variantes de polipéptidos de cadena J de secuencia nativa que comprenden un grupo funcional de unión extraño introducido en la secuencia nativa. La introducción se puede lograr por cualquier medio, incluida la fusión directa o indirecta de un grupo funcional de unión extraña o por unión a través de un enlazador químico. El término "cadena J humana modificada" abarca específicamente, sin limitación, una cadena J humana de secuencia nativa de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 modificada por la introducción de un grupo funcional de unión. El término abarca específicamente, sin limitación, una secuencia J de cadena nativa humana de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 modificada por la introducción de un grupo funcional de unión extraña que no interfiere con una polimerización eficiente (dimerización) de IgM o IgA y unión de dichos polímeros (dímeros) a un objetivo.

55 El término "grupo funcional de unión" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio para abarcar cualquier entidad química capaz de unirse específicamente a un objetivo, tal como un antígeno. Los ejemplos de

- restos de unión incluyen, sin limitación, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, conjugados de anticuerpo-fármaco, moléculas similares a anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de moléculas similares a anticuerpos, proteínas solubles y unidas a membrana, ligandos, receptores, virus -como partículas, toxinas proteicas, enzimas, y estructuras alternativas. Los restos de unión preferidos son polipéptidos (incluyendo péptidos), 5 preferiblemente con una función biológica. Una función biológica ejemplar es la capacidad de un grupo funcional de unión para unirse y activar una célula efectora, como un linfocito B, un linfocito T o un linfocito citolítico natural (NK).
- El término "polipéptido" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio e incluye secuencias peptídicas. El término "péptido" generalmente describe cadenas moleculares lineales de aminoácidos que contienen 10 hasta aproximadamente 60, preferiblemente hasta aproximadamente 30 aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos.
- El término "extraño" con referencia a un "grupo funcional de unión" se utiliza en el presente documento para referirse 15 a un grupo funcional de unión no presente en una secuencia de polipéptido nativo de referencia en la misma ubicación. Por lo tanto, una secuencia polipeptídica extraña (incluidas las secuencias peptídicas), podría estar comprendida dentro de la secuencia nativa correspondiente, pero en una ubicación diferente. En una realización preferida, la secuencia "extraña" no está presente en la secuencia nativa correspondiente en ninguna ubicación.
- El término "anticuerpo monoclonal", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de 20 una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen 25 diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se 30 utilizarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al. (1975) *Nature* 256: 495, o puede hacerse mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos Nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislararse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al. (1991) *Nature* 352: 624-628 y Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, por ejemplo.
- Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen específicamente anticuerpos "químéricos" (inmunoglobulinas) en la que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica o homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular, mientras que el resto de la (s) cadena (s) es idéntica o homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie, así como 35 fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada (patente de los Estados Unidos Nº 4.816.567 y Morrison y otros (1984) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 81: 6851-6855).
- Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como el 40 ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de la estructura Fv (FR) de la inmunoglobulina humana también se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para 45 refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la 50 inmunoglobulina de un humano. Para más detalles, ver Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-329; y Presta (1992) *Curr. Op. Struct Biol.* 2:593-596.
- Un anticuerpo "aislado" en este documento es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural en una célula huésped recombinante. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden 55 incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos, así como subproductos no deseados de la producción. En una realización preferida, un anticuerpo aislado en este documento se purificará (1) a más del 95% en peso, o más del 98% en peso, o más del 99% en peso, según lo determinado por SDS-PAGE o SEC- Métodos de HPLC, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de aminoácidos, o (3) a la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras. Utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata.
- Normalmente, un anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

El término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" se refiere a la unión de un grupo funcional de unión a una diana de unión, como la unión de un anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo, un epítopo en un particular polipéptido, péptido u otro objetivo (por ejemplo, un objetivo de la glicoproteína), y significa la unión que es mediblemente diferente de una interacción no específica (por ejemplo, una interacción no específica puede ser la unión a la albúmina de suero bovino o caseína). La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de un grupo funcional de unión, o un anticuerpo, o un anticuerpo modificado por introducción de un grupo funcional de unión, a una molécula diana en comparación con la unión a una molécula de control. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante la competencia con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica la unión específica si la unión del objetivo marcado a una sonda es inhibida competitivamente por el exceso de objetivo no marcado. El término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítopo en un polipéptido particular, como se utiliza en el presente documento, puede exhibirse, por ejemplo, por una molécula que tenga una Kd para el objetivo de al menos aproximadamente 200 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 150 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 100 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 60 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 50 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 40 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 30 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 20 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 10 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 8 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 6 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 4 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 2 nM, alternativamente, al menos aproximadamente 1 nM, o más. En ciertos casos, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido o epítopo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítopo polipeptídico.

"Afinidad de unión" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un sitio de unión único de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se utiliza en este documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1: 1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y generalmente puede representarse por la constante de disociación (Kd). Por ejemplo, la Kd puede ser de aproximadamente 200 nM, 150 nM, 100 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 8 nM, 6 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, o más fuerte. La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos los descritos en este documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos por más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos para medir la afinidad de unión.

Como se utiliza en el presente documento, "Kd" o "valor de Kd" se refiere a una constante de disociación medida por una técnica apropiada para el anticuerpo y el par objetivo, por ejemplo, usando ensayos de resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, usando un BIACore™-2000 o un BIACore™-3000 (BIACore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C. con chips de antígeno CM5 inmovilizado en aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU).

Los términos "conjugado", "conjugado" y "conjugación" se refieren a todas y cada una de las formas de enlace covalente o no covalente e incluyen, sin limitación, la fusión genética o química directa, el acoplamiento a través de un enlazador o un agente de reticulación, y asociación no covalente.

El término "fusión" se utiliza en el presente documento para referirse a la combinación de secuencias de aminoácidos de diferente origen en una cadena polipeptídica mediante la combinación en marco de sus secuencias de nucleótidos codificantes. El término "fusión" abarca explícitamente las fusiones internas, es decir, la inserción de secuencias de diferente origen dentro de una cadena polipeptídica, además de la fusión con uno de sus extremos. El término "fusión" se utiliza aquí para referirse a la combinación de secuencias de aminoácidos de diferente origen.

El término "valente" como se utiliza en este documento denota la presencia de un número específico de sitios de unión en un anticuerpo. Como tales, los términos "bivalente", "tetravalente" y "hexavalente" denotan la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente. Por lo tanto, si en un anticuerpo IgA biespecífico según la presente invención cada unidad de unión es bivalente, el anticuerpo IgA biespecífico tendrá 4 valencias.

El término "epítopo" incluye cualquier determinante molecular capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el determinante del epítopo incluye grupos de moléculas químicamente activas en la superficie tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítopo es una región de un antígeno que está unido por un anticuerpo. Una "región de unión" es una región en una diana de unión unida por una molécula de unión.

"Especificidad poliepitópica" se refiere a la capacidad de unirse específicamente a dos o más epítopos diferentes en el mismo o diferente objetivo (s). "Monoespecífico" se refiere a la capacidad de unir solo un epítopo. De acuerdo con una realización, el anticuerpo IgM biespecífica se une a cada epítopo con una afinidad de al menos 10^{-7} M, o 10^8 M o mejor.

El término "objetivo" o "objetivo de unión" se utiliza en el sentido más amplio e incluye específicamente polipéptidos, sin limitación, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, células y otras moléculas con o sin función biológica tal como existen en la naturaleza.

5 El término "antígeno" se refiere a una entidad o fragmento del mismo, que puede unirse a un anticuerpo o desencadenar una respuesta inmune celular. Un inmunógeno se refiere a un antígeno, que puede provocar una respuesta inmune en un organismo, particularmente un animal, más particularmente un mamífero que incluye un humano. El término antígeno incluye regiones conocidas como determinantes antigenicos o epítopos, como se definió anteriormente.

10 Como se utiliza en el presente documento, el término "inmunogénico" se refiere a sustancias que provocan la producción de anticuerpos y/o activan linfocitos T y/o otras células inmunitarias reactivas dirigidas contra un antígeno del inmunógeno.

15 Un "sitio de unión a antígeno" o "región de unión a antígeno" de un anticuerpo de la presente invención contiene típicamente seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuyen en diversos grados a la afinidad del sitio de unión por el antígeno. Hay tres CDR de dominio variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDR de dominio variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La extensión de las regiones CDR y marco (FR) se determina por comparación con una base de datos compilada de secuencias de aminoácidos en las que esas regiones se han definido de acuerdo con la variabilidad entre las secuencias y/o la información estructural de los complejos de anticuerpo/antígeno. También se incluyen dentro del alcance de la invención los sitios de unión a antígenos funcionales que comprenden menos CDR (es decir, donde la especificidad de unión se determina mediante tres, cuatro o cinco CDR). Menos de un conjunto completo de 6 CDR puede ser suficiente para enlazar a algunos objetivos de enlace. Por lo tanto, en algunos casos, las CDR de un dominio VH o VL solo serán suficientes. Además, ciertos anticuerpos pueden tener sitios de unión no asociados a CDR para un antígeno. Dichos sitios de unión están incluidos específicamente en la presente definición.

20 25 El término "célula huésped", tal como se utiliza en la solicitud actual, denota cualquier tipo de sistema celular que pueda diseñarse para generar los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. En una realización, las células de ovario de hámster chino (CHO) se usan como células huésped.

30 35 Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable y todas estas designaciones incluyen la progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "linfocitos Transformadas" incluyen la célula sujeto principal y los cultivos derivados de ellos sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica que la seleccionada en la célula originalmente transformada.

40 45 Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una secuencia previa o líder secretor está unido operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia de codificación si está posicionado de modo que facilite la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que están vinculadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en el marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se logra mediante la ligadura en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

Descripción detallada

Diseño y producción de Anticuerpos con cadena J modificada

50 55 La IgM es la primera inmunoglobulina producida por los linfocitos B en respuesta a la estimulación por el antígeno, y está presente a aproximadamente 1,5 mg/ml en suero con una vida media de 5 días. IgM es una molécula pentamérica o hexamérica. Al igual que la IgG, los monómeros IgM constan de dos cadenas ligeras y dos pesadas. Sin embargo, mientras que la IgG contiene tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3), la cadena pesada (μ) de IgM contiene adicionalmente un cuarto dominio constante (CH4), similar a las cadenas pesadas ϵ en IgE. Este dominio constante adicional se ubica en lugar de la región bisagra rica en prolina de IgG e IgA que es responsable de la flexibilidad rotacional de los dominios Fab de unión a antígeno en relación con el dominio Fc de los anticuerpos IgG e IgA.

Cinco monómeros de IgM forman un complejo con una pequeña cadena polipeptídica adicional (la cadena J) para formar una molécula de IgM nativa. Se considera que la cadena J facilita la polimerización de las cadenas μ antes de que la IgM se secrete de las células productoras de anticuerpos. Si bien la cristalización de IgM ha resultado ser notoriamente desafiante, Czajkowsky y Shao (PNAS 106 (35): 14960- 14965, 2009) publicaron recientemente un modelo estructural de IgM basado en homología, basado en la estructura del dominio IgE Fc y emparejamiento de disulfuro conocidos. Los autores informan que el pentámero IgM humano es una molécula en forma de hongo con un

sesgo de flexión. La cadena pesada (μ) de IgM contiene cinco sitios de glicosilación unidos a N: Asn-171, Asn-332, Asn-395, Asn-402 y Asn-563.

La inmunoglobulina A (IgA), como la principal clase de anticuerpos presentes en las secreciones de la mucosa de la mayoría de los mamíferos, representa una primera línea de defensa clave contra la invasión de patógenos inhalados e ingeridos. IgA también se encuentra en concentraciones significativas en el suero de muchas especies, donde funciona como una segunda línea de defensa que media la eliminación de patógenos que han penetrado la superficie de la mucosa. Los receptores específicos para la región Fc de IgA, Fc α R, son mediadores clave de la función efectora de IgA. La IgA humana puede tener dos genes diferentes de región constante pesada (C α) de IgA que dan lugar a las dos subclases, IgA1 e IgA2. La principal diferencia entre IgA1 e IgA2 reside en la región bisagra que se encuentra entre los dos brazos Fab y la región Fc. IgA1 tiene una región bisagra extendida debido a la inserción de un tramo duplicado de aminoácidos, que está ausente en IgA2. La IgA tiene la capacidad de formar dímeros, en los cuales se postula que dos unidades monoméricas, cada una de las cuales comprende dos cadenas pesadas y cadenas ligeras, están dispuestas en una configuración de extremo a extremo estabilizada por enlaces de disulfuro e incorporación de una cadena J. La IgA dimérica, producida localmente en los sitios de la mucosa, se transporta a través del límite de las células epiteliales y se envía a las secreciones mediante la interacción con el receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR). Durante este proceso, el pIgR se escinde y el fragmento principal, denominado componente secretor (SC), se une covalentemente al dímero de IgA.

Tanto la IgA como la IgM poseen una extensión de 18 aminoácidos en el término C llamada "pieza de cola" (tp). Las colas de IgM (μ tp) e IgA (α tp) difieren en siete posiciones de aminoácidos. La pieza de cola IgM e IgA está altamente conservada entre varias especies animales. Se ha demostrado que el residuo de cisteína penúltima conservada en las colas de IgA e IgM está involucrado en la polimerización. Ambas piezas de la cola contienen un sitio de adición de carbohidratos unidos a N, cuya presencia se requiere para la formación de dímeros en la incorporación de IgA y de la cadena J y la formación de pentámeros en IgM. Sin embargo, la estructura y la composición de los carbohidratos unidos a N en las piezas de la cola difieren, lo que sugiere diferencias en la accesibilidad de los glucanos al procesamiento por glicosiltransferasas.

Se han informado las secuencias de nucleótidos y/o proteínas de las cadenas J de humanos y varias especies de animales vertebrados, como vacas, ratones, aves, anfibios y conejos. La cadena J humana contiene ocho residuos de cisteína, dos (Cys13 y Cys69) están involucrados en enlaces disulfuro con las cadenas α o μ (en IgA e IgM, respectivamente), y seis están involucrados en enlaces disulfuro intracadena (Cys13: Cys101, Cys72: Cys92, Cys109: Cys134). La estructura cristalina tridimensional de la cadena J no ha sido reportada.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el reconocimiento de que la cadena J de los anticuerpos IgM e IgA pueden modificarse mediante la introducción de una especificidad de unión (grupo funcional de unión), sin interferir con la capacidad del anticuerpo IgM o IgA para unirse a su (s) objetivo (s) de unión. Por consiguiente, la presente invención se refiere a cadenas J modificadas que comprenden un grupo funcional de unión introducido en una cadena J de secuencia nativa, tal como una cadena J humana de secuencia nativa de la SEQ ID NO: 1. La invención se refiere además a moléculas de unión que comprenden una cadena J modificada. La molécula de unión puede ser, por ejemplo, un anticuerpo IgM, un anticuerpo IgA o un anticuerpo híbrido IgG/IgM o IgG/IgA, que puede contener una pieza de cola IgM o IgA en la cadena pesada de IgG y así combinar las propiedades de IgG e IgA o IgA, incluida la capacidad de incorporar y formar polímeros con una cadena J modificada de la presente invención. Para obtener más detalles sobre los anticuerpos híbridos IgG/IgM e IgG/IgA, consulte, p. Koteswara et al, Clinical Immunology 2001, 101 (1): 21-31.

La cadena J modificada comprende un grupo funcional de unión extraño, que incluye, pero no se limita a, un polipéptido (incluyendo péptidos) capaz de unirse específicamente a una diana de unión, o componentes catalíticos, tales como proteasas de tipo enzimático. Como se discutió anteriormente, los restos de unión incluyen, sin limitación, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, conjugados de anticuerpo-fármaco, fragmentos de unión a antígeno de conjugado de anticuerpo-fármaco, moléculas similares a anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de moléculas similares a anticuerpo, proteínas solubles y unidas a la membrana, ligandos, receptores, partículas similares a virus, toxinas proteínicas, componentes catalíticos, como enzimas y proteasas similares a enzimas, y estructuras alternativas. Se enfatiza que cualquier tipo de grupo funcional de unión puede introducirse en una cadena J, siguiendo las enseñanzas de la presente divulgación, seleccionando apropiadamente la ubicación, el tipo de adición (por ejemplo, fusión directa o indirecta, encadenamiento químico, etc.).

En una realización preferida, el grupo funcional de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo (también denominado "fragmento de anticuerpo"), que incluye anticuerpos monoespecíficos, biespecíficos y multiespecíficos y fragmentos de anticuerpos. El término "fragmento de anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio e incluye, sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, scFv y (scFv)₂, fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos lineales, Moléculas de anticuerpo de cadena simple, minicuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En una realización preferida, el fragmento de anticuerpo es un scFv.

En otra realización preferida, el grupo funcional de unión es una molécula similar a un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo de dominio humano (dAb), una molécula de redireccionamiento de afinidad dual (DART), un

diacuerpo, un di-diacuerpo, doble anticuerpo de dominio variable, un anticuerpo de dominio variable apilado, un inmuno farmacéutico modular pequeño (SMIP), un Surrobody, un dominio de intercambio de cadena (SEED)-cuerpo o TandAb.

5 El grupo funcional de unión puede ser un ligando, tal como una neurotrofina, una interleucina, un factor molecular soluble o un factor de crecimiento.

Los receptores, como moléculas de unión, incluyen receptores de la superficie celular ligados a los canales iónicos, ligados a las proteínas G y ligados a enzimas. Los ejemplos específicos incluyen, entre otros, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, TNFR, PDL1 y CTLA-4.

10 En una realización preferida adicional, el grupo funcional de unión es un andamio alternativo. En este contexto, el término "andamio" pretende describir un marco de proteínas que puede transportar aminoácidos alterados o inserciones de secuencia que confieren a las variantes de proteínas la capacidad de unirse a objetivos específicos. Los andamiajes alternativos de proteínas incluyen, sin limitación, CTLA-4, tendamistat, fibronectina, lipocalinas, receptor de linfocitos T, CBM4-2, dominio de proteína A, IgM, proteínas de diseño AR, proteínas de diseño TPR, barra de zinc, pVIII, polipéptido pancreático aviar, GCN4, dominio WW, dominios de homología SRC 2 y 3, dominios 15 PDZ, TEM-1, β-lactamasa, GFP, tiorredoxina, nucleasa estafilocócica, PHD-dedo, cl-2, BPTI, APPI, HPSTI, ecotina, LACI-D1, LDTI, MTI-II, toxinas de escorpión péptidos, defensinas de insecto A, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, citocromo b₅₆₂, dominio A del receptor de LDL, γ-crystalina, ubiquitina, transferrina, dominio similar a la lectina tipo C. las estructuras alternativas preferidas son las darpinas, los dominios de fibronectina y las adnectinas. Para más detalles, véase Binz HK et al, 2005 Nature Biotechnology 23 (10): 1257-1268.

20 El grupo funcional de unión puede introducirse en la secuencia de la cadena J nativa en cualquier ubicación que permita la unión del grupo funcional de unión a su objetivo de unión sin interferir con la unión de la molécula de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA del receptor a su objetivo vinculante u objetivos vinculantes. Las ubicaciones preferidas incluyen en o cerca del término C, en o cerca del extremo N o en una ubicación interna que, en base a la estructura tridimensional de la cadena J, es accesible. En realizaciones preferidas, el grupo funcional de unión se introduce en 25 la cadena J de secuencia nativa sin aproximadamente 10 residuos del extremo C o sin aproximadamente 10 residuos de aminoácido del extremo N, donde la secuencia J de secuencia nativa es preferiblemente cadena J de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el grupo funcional de unión se introduce en la cadena J humana de secuencia nativa de la SEQ ID NO: 1 entre los restos 92 y 101 de cisteína de la SEQ ID NO: 1, o en una ubicación equivalente 30 de otra cadena J de secuencia nativa. En una realización adicional, el grupo funcional de unión se introduce en una secuencia J de cadena nativa, tal como una cadena J de SEQ ID NO: 1, en o cerca de un sitio de glicosilación. Más preferiblemente, el grupo funcional de unión se introduce en la secuencia J de la cadena nativa humana de la SEQ ID NO: dentro de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal.

35 La introducción puede realizarse mediante fusión directa o indirecta, es decir, mediante la combinación de las secuencias de aminoácidos de la cadena J y del grupo funcional de unión en una cadena polipeptídica mediante la combinación en el marco de sus secuencias de nucleótidos codificantes, con o sin un enlazador peptídico. El enlazador peptídico (fusión indirecta), si se usa, puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1 a 50, o aproximadamente 1 a 40, o aproximadamente 1 a 30, o aproximadamente 1 a 20, o aproximadamente 1 a 10, o aproximadamente 10 a 20 residuos de aminoácidos, y pueden estar presentes en uno o ambos extremos del grupo 40 funcional de unión para ser introducido en la secuencia de la cadena J. En una realización preferida, el enlazador peptídico es de aproximadamente 10 a 20, o 10 a 15 aminoácidos de longitud. En otra realización preferida, el enlazador peptídico tiene una longitud de 15 aminoácidos.

45 El grupo funcional de unión también se puede adjuntar a la secuencia de la cadena J nativa mediante un enlace químico utilizando reticulantes de proteínas heterobifuncionales que contienen dos grupos funcionales diferentes, que tienen su propia reactividad y selectividad. Estos reticuladores se pueden usar en un proceso de una etapa o se pueden usar para crear proteínas activadas, que a menudo se pueden conservar y hacer reaccionar con la segunda biomolécula en una etapa separada. Así, por ejemplo, se puede usar un reactivo de reticulación heterobifuncional para formar conjugados entre una cadena J y un grupo funcional de unión. Los grupos reactivos incluyen, sin limitación, grupos reactivos con imina (tales como NHS o Sulfo-NHS), grupos de maleimida, y similares. Tales reticuladores, que pueden ser escindibles o no escindibles, se han utilizado, por ejemplo, en la formación de 50 proteínas portadoras de hapteno y en la preparación de conjugados de enzima-anticuerpo. Químicamente, los reticuladores escindibles incluyen específicamente, sin limitación, los enlazadores basados en disulfuro, hidrazona y péptidos. Un enlazador enzimático lóbil bien conocido y muy estudiado es un enlazador de valina-citrulina, pero también se conocen y son adecuados otros enlazadores peptídicos. Representantes típicos de enlazadores no escindibles incluyen tioéteres, tales como SMCC (N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato). 55 Para más detalles ver, por ejemplo, Ducry L y Stump B, Bioconjugate Chem. 2010, 21: 5-13. Para obtener una lista de otros enlazadores adecuados, consulte, por ejemplo, Klein et al, Ingeniería de proteínas, diseño y selección; 2014, 27 (10): 325-330.

Si bien la cadena J modificada contiene generalmente un grupo funcional de unión extraño, también es posible introducir más de un grupo funcional de unión en una cadena J.

La cadena J modificada puede producirse mediante técnicas bien conocidas de tecnología de recombinación de ADN, mediante la expresión de ácido nucleico que codifica la cadena J modificada en un organismo huésped procariótico o eucariótico adecuado, como las células CHO o E. coli. Por lo tanto, la cadena J modificada puede expresarse, por ejemplo, en E. coli, como describen Symersky y otros, Mol Immunol 2000, 37: 133-140.

5 En una realización, la cadena J puede modificarse inicialmente mediante la inserción de un sitio de reconocimiento enzimático, y modificarse después de la traducción mediante un péptido o un enlazador no peptídico, que puede unir cualquier grupo funcional de unión extraña a la cadena J, como, por ejemplo, pequeña molécula citotóxica para hacer un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC).

10 La cadena J modificada también se puede coexpresar con las cadenas pesada y ligera del anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA del receptor. Aunque debido a su estructura compleja, la producción a gran escala de IgM recombinante ha sido difícil, se han informado varios sistemas de producción recombinante para IgM utilizando células no linfoides, incluida la coexpresión de las cadenas pesada (H) y ligera (L) de IgM, en células de glioma C6, células CHO y células HeLa (ver, por ejemplo, W089/01975 y Wood et al, J. Immunol. 145, 3011-3016 (1990) para la expresión en células CHO). La expresión de un anticuerpo monoclonal IgM en E. coli, con o sin una cadena J, se describe, p. Ej. en Azuma et al, Clin Cancer Res 2007, 13 (9): 2745-2750. La producción de IgM en una línea celular de retina humana inmortalizada que expresa proteínas E1A y E1B de un adenovirus se describe en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos Nº 20060063234.

15 El anticuerpo receptor puede ser monoespecífico, biespecífico o multiespecífico. Las moléculas de unión a IgM e IgA biespecíficas y multiespecíficas, incluidos los anticuerpos, se describen, por ejemplo, en los números de serie de solicitudes de los Estados Unidos 61/874,277 y 61/937,984.

Aplicaciones de anticuerpos con cadena J modificada

Los anticuerpos que comprenden una cadena J modificada de la presente invención tienen aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico generalizadas.

20 En una realización, los anticuerpos que comprenden una cadena J modificada se unen a dos o más sitios en la misma diana soluble, como, por ejemplo, VEGF, TNF α o IL6. El propósito puede, por ejemplo, antagonizar múltiples sitios en la proteína y/o aumentar la avidez hacia un objetivo determinado.

25 En otra realización, los anticuerpos que comprenden una cadena J modificada en el presente documento se unen a dos o más sitios en el mismo objetivo de la superficie celular (receptor), como EGFR o HER2 (ErbB2). De esta forma, por ejemplo, tales anticuerpos podrían dirigirse tanto a los epítopos 4D5 como a los 2C4 en una molécula de HER2. Este enfoque puede aumentar la bio-potencia y/o la avidez hacia un objetivo determinado.

30 En otra realización más, los anticuerpos que comprenden las cadenas J modificadas de la presente invención se unen a dos o más dianas solubles diferentes (proteínas o péptidos globulares), v.g. TNF α e IL6, VEGF α y Ang2, o dos citoquinas. Este enfoque podría resultar, por ejemplo, en un bloqueo más completo de una ruta específica; el bloqueo de la llamada "tormenta de citoquinas", es decir, la activación indeseable de linfocitos T que resulta de ciertos anticuerpos biespecíficos multivalentes, como los anticuerpos biespecíficos para el antígeno CD3, o coordina una enzima y su sustrato, por ejemplo. Factor IXA y Factor X. Los ejemplos específicos incluyen, sin limitación, anticuerpos biespecíficos con cadena J modificada, donde una primera especificidad se dirige a VEGF y una segunda especificidad se dirige a Ang2 o DLL4 (anti-angiogénesis), o una primera especificidad es dirigida a TNF y una segunda especificidad está dirigida a Ang2 o IL-17 (propiedades antiinflamatorias), donde se puede introducir una especificidad en la cadena J de un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA, o un anticuerpo fragmento de unión a antígeno del mismo.

35 En una realización adicional, los anticuerpos que comprenden una cadena J modificada pueden unirse a una o más dianas solubles y a una o más dianas de receptor de la superficie celular, tales como un factor angiogénico y un receptor específico neovascular. El propósito de este enfoque también puede ser una mayor entrega y bloqueo en sitios o tejidos específicos.

40 En una realización adicional más, los anticuerpos que comprenden una cadena J modificada están diseñados para unirse a dos o más dianas de receptores de superficie celular diferentes, como, por ejemplo, HER1, HER2 (ErbB2) y HER3 (ErbB3), inhibiendo múltiples dianas a través de la misma o diferentes vías. Esto puede resultar en una mejora de la especificidad y la selectividad y/o en un bloqueo más completo de una ruta determinada. Los ejemplos específicos de tales anticuerpos incluyen, sin limitación, anticuerpos biespecíficos con una cadena J modificada en la que una especificidad se dirige a HER2 y otra específica se dirige a HER3; o una especificidad se dirige a EGFR (HER1) y otra especificidad se dirige a HER2. Otros anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA biespecíficos con una cadena J modificada pueden, por ejemplo, unirse a EGFR y HER3, IL-1 α e IL-1 β , IL-4 e IL-13, Ang-2 y VEGF-A, Factor IXA y Factor X, o IL-17A e IL-17F.

45 Los anticuerpos que comprenden una cadena J modificada de la presente invención también pueden diseñarse para unirse a una o más dianas solubles o dianas de receptor de superficie celular y una o más dianas de tiempo de

residencia largas, tales como, por ejemplo, TNF α y/o VEGF y albúmina sérica. Se espera que estas moléculas tengan una vida media en circulación más larga que las moléculas de unión sin la especificidad de albúmina.

En una realización adicional, los anticuerpos que comprenden una cadena J modificada en el presente documento pueden unirse a una o más dianas solubles y una o más proteínas de la matriz y/o sustratos, tales como, por ejemplo, VEGF α y ácido hialurónico. Las moléculas de unión multiespecífica resultantes pueden encontrar utilidad, por ejemplo, en la terapia antiangiogénica de afecciones oculares, como la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), debido a su mayor tiempo de residencia en el espacio intraocular.

Anticuerpos que comprenden una cadena J modificada y que se unen a uno o más dianas solubles o receptoras, más uno o más receptores transportadores (es decir, receptor de transferrina), por ejemplo, anti-EGFRvIII (forma mutante con exón III eliminado) encontró que el glioblastoma combinado con la especificidad de anti-transferrina puede tener utilidad en la administración de anticuerpos a través de la barrera hematoencefálica.

En una realización preferida, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA en el presente documento comprenden una cadena J modificada con especificidad de unión para una célula inmune, tal como un linfocito T, linfocito citolítico natural, un macrófago o un neutrófilo, y se unen a un antígeno expresado en una célula de la enfermedad o patógeno. Dado que una molécula de IgM comprende 5 unidades de unión, y una molécula de IgA es un dímero que comprende dos unidades de unión, tales moléculas son significativamente más potentes debido a su mayor avidez que los anticuerpos IgG biespecíficos. Además, al activar y redirigir las células efectoras, p. Ej. Los linfocitos T efectoras, a las células de la enfermedad, tejidos o patógenos dirigidos, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA en el presente documento inducen una respuesta inmune contra el objetivo, lo que aumenta aún más la potencia y la eficacia. Debido a estas propiedades beneficiosas, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA en el presente documento, que comprenden una cadena J modificada, son especialmente ventajosos en situaciones en las que los anticuerpos IgG se unen a su objetivo con baja afinidad. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA en este documento pueden comprender el dominio de unión de un anticuerpo IgG terapéutico.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA en el presente documento que comprenden una cadena J modificada se pueden usar para el tratamiento del cáncer. Se anticipa que cualquier tipo de tumor y cualquier tipo de antígeno asociado al tumor pueden ser atacados. Los tipos de cáncer ejemplares incluyen, sin limitación, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, cáncer biliar, cáncer de mama, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, esofágico, gástrico, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, cáncer de pulmón, cáncer medular de tiroides, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, glioma, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de próstata y cáncer de vejiga urinaria. Sin embargo, el experto en la materia se dará cuenta de que los antígenos asociados a tumores son conocidos en la técnica para prácticamente cualquier tipo de cáncer.

Los antígenos asociados a tumores que pueden ser atacados por los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de la presente invención incluyen, sin limitación, alfa-fetoproteína (AFP), antígenos asociados, Ba 733, BAGE, antígeno BrE3 , CA125, CAMEL, CAP-1, anhidrasa carbónica IX, CASP-8/m, CCCL19, CCCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20 , CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD70L, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CTLA- 4, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1 α , antígeno-p específico del colon (CSAp), CEA (CEACAM5), CEACAM6, c-Met, DAM, EGFR (HER1, ErbB1), ErbB2 (HER2), ErbB4 (HER3)), EGFRvIII, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Flt-1, Flt-3, receptor de folato, antígeno G250, GAGE, gp 100, GRO- β , HLA-DR, HM1.24, gonadotropina coriónica humana (HCG) y sus subunidades, HER2/neu, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF-1), HSP70-2M, HST-2, Ia , IGF-1R, IFN- γ IFN- α , IFN- β , IFN- λ , IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL- 6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-25, factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), antígeno KC4, KS-1 -antígeno, KS1-4, Le-Y, LDR/FUT, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP -1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MUC13, MUC16, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, antígeno PAM4, mucina del cáncer pancreático, receptor PD-1, factor de crecimiento placentario, p53, PLAGL2, fosfatasa ácida prostática, PSA, PRAME, PSMA, P1GF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T 101, SAGE, S 100, survivín, survivín-2B, TAC, TAG-72, tenascín, receptores TRAIL, TNF-alfa., antígeno Tn, antígenos de Thomson-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, VEGFR, fibronectina ED-B, WT-1, antígeno 17-1A, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, marcador de angiogénesis, bcl-2, bcl-6, Kras.

Como se discutió anteriormente, para aplicaciones oncológicas, los anticuerpos que comprenden una cadena J modificada pueden diseñarse para desencadenar la función de destrucción de las células inmunitarias contra las células cancerosas dirigidas. Así, por ejemplo, la cadena J de los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA, o sus fragmentos de unión a antígeno, pueden modificarse introduciendo en una cadena J nativa una especificidad de unión para una célula inmunitaria, como como un linfocito T o un linfocito citolítico natural (NK), mientras que el anticuerpo IgA, IgG/IgM o IgG/IgA proporciona especificidad de unión a una célula diana, por ejemplo un marcador tumoral, como un oncogén, en la superficie de una célula tumoral, que incluye, por ejemplo, uno o más de los antígenos asociados a tumores enumerados anteriormente.

- En el caso de los linfocitos T, el grupo de diferenciación 3 (CD3) es un complejo proteico multimérico, conocido históricamente como el complejo T3, y está compuesto por cuatro cadenas polipeptídicas distintas (ϵ , γ , δ , ζ) que se ensamblan y funcionan como tres pares de dímeros ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$). El complejo CD3 sirve como un co-receptor de linfocitos T que se asocia no covalentemente con el receptor de linfocitos T (TCR). Los componentes de este complejo CD3, especialmente los CD3 ϵ , son dianas para una cadena J modificada de un anticuerpo IgM que se une específicamente a un antígeno asociado a un tumor. Aunque la cadena J modificada específica para los linfocitos T efectoras se une preferiblemente al antígeno CD3 (CD3 ϵ), otros antígenos expresados en linfocitos T efectoras son conocidos y pueden ser atacados por la cadena J modificada. Los ejemplos de antígenos de linfocitos T incluyen, entre otros, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD69 y CD90.
- 5 Los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA ejemplares que incluyen una cadena J modificada con especificidad de unión a CD3, pueden incluir las regiones de unión de anticuerpos IgG conocidos a antígenos asociados a tumores, como, por ejemplo, blinatumomab (también conocido como MT103) (anti-CD19), CD19hA19 (anti-CD19, patente de los Estados Unidos No. 7.109.304), hPAM4 (anti-mucina, patente de los Estados Unidos No. 7.282.567), hA20 (anti-CD20, patente de los Estados Unidos No. 7.251.164), hIMMU31 (anti-AFP, patente de los Estados Unidos N° 7.300.655), hLL1 (anti-CD74, patente de los Estados Unidos N° 7.312.318), hLL2 (anti-CD22, patente de los Estados Unidos No. 7.074.403), hMu-9 (anti-CSAp, patente de los Estados Unidos N° 7.387.773), hL243 (anti-HLA-DR, patente de los Estados Unidos N° 7.612.180), hMN-14 (anti-CEACAM5, patente de los Estados Unidos No. 6.676.924), hMN-15 (anti-CEACAM6, EE.UU. Patente No. 7,541,440), hRS7 (anti-EGP-1, US Pat. No. 7,238,785), hMN-3 (anti-CEACAM6, US Pat. No. 7,541,440), Ab124 y Ab125 (anti-CXCR4, US Pat. No. 7,138,496).
- 10 En una realización específica, un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que comprende la región de unión a CD19 de blinatumomab comprende una cadena J modificada que comprende la región de unión a CD3 de blinatumomab. Este anticuerpo puede ser utilizado, por ejemplo, para el tratamiento del linfoma no Hodgkin o leucemia linfoblástica aguda de la serie de linfocitos B (B-ALL).
- 15 En otra realización específica, un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que comprende la región de unión a CD20 de rituximab comprende una cadena J modificada con especificidad de CD3, tal como una cadena J modificada que comprende la región de unión a CD3 de blinatumomab.
- 20 En otra realización específica, un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que comprende la región de unión a CD20 de rituximab comprende una cadena J modificada con especificidad de CD3, tal como una cadena J modificada que comprende la región de unión a CD3 de blinatumomab.
- 25 En otra realización específica, un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que comprende la región de unión a EpcAM de MT110 comprende una cadena J modificada con especificidad de CD3, tal como una cadena J modificada que comprende la región de unión a CD3 de MT110. Tales anticuerpos biespecíficos se pueden usar para el tratamiento del cáncer gastrointestinal.
- 30 Los anticuerpos alternativos que pueden proporcionar regiones de unión para usar en combinación con una cadena J modificada con especificidad de unión a CD3 incluyen, por ejemplo, abciximab (anti-glucoproteína IIb/IIIa), alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab (anti-CD20), panitumumab (anti-EGFR), tositumomab (anti-CD20), trastuzumab (anti-ErbB2), lambrolizumab (anti-PD-1 receptor), nivolumab (receptor anti-PD-1), ipilimumab (anti-CTLA-4), abagovomab (anti-CA-125), adecatumumab (anti-EpcAM), atlizumab (receptor anti-IL-6), benralizumab (anti-CD 125), obinutuzumab (GA101, anti-CD20), CC49 (anti-TAG-72), AB-PG1-XG 1-026 (anti-PSMA, solicitud de patente de los Estados Unidos Ser. N° 11/983.372, depositado como ATCC PTA-4405 y PTA-4406), D2/B (anti-PSMA, WO 2009/130575), tocilizumab (receptor anti-IL-6), basiliximab (anti-CD25), daclizumab (anti-CD25), efalizumab (anti-CD11a), GA101 (anti-CD20; Glycart Roche), atalizumab (anti-alfa.4 integrin), omalizumab (anti-IgE); anti-TNF-alfa. Anticuerpos como CDP571 (Ofei et al, 2011, Diabetes 45: 881-85), MTNFAI, M2TNFAI, M3TNFAI, M3TNFABI, M302B, M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL), infliximab (Centocor, Malvern, Pa.), Certolizumab pegol (UCB, Bruselas, Bélgica), anti-CD40L (UCB, Bruselas, Bélgica), adalimumab (Abbott, Abbott Park, IL), BENLYSTA.RTM. (Ciencias del genoma humano); anticuerpos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, como Alz 50 (Ksiezak-Reding et al, 1987, J Biol Chem 263: 7943-47), gantenerumab, solanezumab e infliximab; anticuerpos anti-fibrina como 59D8, T2GIs, MH1; Anticuerpos anti-CD38 tales como MOR03087 (MorphoSys AG), MOR202 (Celgene), HuMax-CD38 (Genmab) o daratumumab (Johnson & Johnson); Anticuerpos anti-VIH como P4/D10 (patente de los Estados Unidos No. 8.333.971), Ab 75, Ab 76, Ab 77 (Paulik et al, 1999, Biochem Pharmacol 58: 1781-90), así como los anticuerpos anti-VIH, descrito en la patente de los Estados Unidos N° 5.831.034, Patente de EE.UU. No. 5,911,989, y Vcelar et al, AIDS 2007; 21 (16): 2161-2170 y Joos et al, Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50(5): 1773-9.
- 35 La figura 19 enumera antígenos diana ejemplares para el tratamiento de cáncer hematológico, tumor epitelial y tumores ricos en glicosílo, y antígenos ejemplares en linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos y neutrófilos para atacar con una cadena J modificada. Debe entenderse que una molécula de IgM que se une a cualquiera de los antígenos tumorales enumerados puede combinarse con una cadena J modificada con cualquiera de las especificidades de unión enumeradas. Por lo tanto, cualquier objetivo de anticuerpo listado en la columna izquierda de la tabla puede combinarse con cualquier objetivo de cadena J modificada listado en la columna derecha.
- 40 En una realización preferida, un pentámero IgM proporciona especificidad de unión a células diana, tales como linfocitos B, mientras que un dominio de unión a una célula efectora, por ejemplo. Un linfocito T puede unirse covalentemente a la cadena J del anticuerpo IgM. Por lo tanto, la cadena J puede modificarse mediante la unión
- 45
- 50
- 55
- 60

covalente de un dominio de unión a CD3 (CD3 ϵ). En esta configuración, el pentámero IgM (que comprende 10 copias de la cadena pesada y 10 copias de la cadena ligera) proporciona especificidad de unión a los linfocitos B diana, mientras que el encadenamiento de los linfocitos T de la cadena J proporciona potencia citotóxica. En otras palabras, la unión del anticuerpo IgM a una diana tumoral adquiere además una función de unión a los linfocitos T.

5 El dominio de unión a CD3 unido covalentemente a una cadena J nativa, o una variante de una cadena J nativa, puede ser, por ejemplo, un Fv de una sola cadena (scFv) de un anticuerpo anti-CD3, o solo una cadena pesada natural anticuerpo, por ejemplo, un camélido (camellos, llamas, alpacas) o un anticuerpo de cadena única de peces cartilaginosos (tiburones, rayas), una estructura, por ejemplo, fibronectina (por ejemplo, fibronectina III) con especificidad de unión a CD3. Si bien ciertas realizaciones preferidas se mencionan específicamente en este 10 documento, debe entenderse que los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA con especificidad de unión a cualquier objetivo, como cualquier antígeno tumoral, que comprende una unión de cadena J modificada a cualquier marcadores de linfocitos T están contemplados y están dentro del alcance de la presente invención.

En una realización, un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA multiespecífico se une a una o más de las dianas tumorales enumeradas anteriormente, mientras que la cadena J se modifica para unirse a las CD3 ϵ . En una 15 realización preferida, el anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA multiespecífica se une a una o más de las dianas tumorales enumeradas en la figura 19, mientras que la cadena J se modifica para unirse a CD3 ϵ .

Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son componentes importantes de la inmunidad innata y desempeñan un papel clave en la defensa del huésped en virtud de su capacidad para liberar citocinas y para mediar la actividad citolítica contra los linfocitos Tumorales y las células infectadas por virus. Los antígenos de linfocitos citolíticos naturales (NK) 20 incluyen, sin limitación, CD 16, CD32a, CD56, CD57, CD64, CD117 (o c-kit), moléculas de adhesión que incluyen la molécula 2 asociada a linfocitos (LFA-2 o CD2), LFA-3 (CD58) y LFA-1 (CD 11 a/CD 18).

Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos que se unen a linfocitos citolíticos naturales (NK) con cadena J modificada incluyen anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA con especificidad de unión a cualquiera de los 25 antígenos tumorales enumerados anteriormente que comprenden una unión de cadena J modificada a un linfocito citolítico natural. En una realización particular, un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA biespecífico con especificidad de unión a HER2 comprende una cadena J modificada para unirse a CD 16, CD32a, CD56 o CD64. En otra realización preferida, un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA multiespecífica se une a cualquiera de las dianas tumorales enumeradas en la columna izquierda de la tabla de la Figura 19, y la cadena J se modifica para unirse a CD 16, CD64 o NKG2D en linfocitos citolíticos naturales (NK).

30 La implicancia de los macrófagos en los anticuerpos modificados de la cadena J de la presente invención se puede proporcionar, por ejemplo, introduciendo una especificidad de CD 14 en la cadena J.

En una realización, un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA multiespecífico se une a una o más de las dianas tumorales enumeradas anteriormente, mientras que la cadena J se modifica para unirse a CD14. En una realización preferida, el anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA multiespecífica se une a una o más de las dianas tumorales 35 enumeradas en la figura 19, mientras que la cadena J se modifica para unirse a CD14.

Los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA con cadena J modificada pueden atacar antígenos basados en carbohidratos, ver, por ejemplo, un artículo revisado de Cazet et al, Breast Cancer Research; 2010, 12:204. Se ha demostrado que los antígenos tumorales basados en carbohidratos tienen una buena asociación tumoral, con formas alternativas de glicosilación que permiten la producción de anticuerpos IgG que se unen a dichos antígenos 40 con una especificidad razonable pero no necesariamente de alta afinidad. El uso de anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA con un aumento asociado de la avidez contra esta clase de antígenos representa grandes oportunidades para nuevos anticuerpos terapéuticos, especialmente junto con la movilización de células efectoras lograda por la modificación de la cadena J. En una realización preferida, el anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA se une a uno o más antígenos tumorales basados en carbohidratos, mientras que la cadena J se modifica para unirse a cualquiera 45 de las células efectoras enumeradas en la figura 19.

En otra realización preferida, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA con cadena J modificada pueden utilizarse como parte de los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA dirigidos contra patógenos. En una realización preferida, los patógenos se seleccionan del grupo que consiste en el virus del VIH, Mycobacterium tuberculosis,

50 Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus resistente a la meticilina, Legionella pneumophila, Streptococcus pyogenes, Escherichia coli, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Pneumococcus, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Hemophilis influenzae B, Treponema pallidum, espiroquetas de la enfermedad de Lyme, Pseudomonas aeruginosa, Mycobacterium leprae, Brucella abortus, virus de la rabia, virus de la influenza, citomegalovirus, virus del herpes simple de tipo I, virus del herpes simple de tipo II, virus de tipo parvo en suero humano, virus respiratorio sincicial, virus varicela-zoster, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus 55 del sarampión, adenovirus, virus de la leucemia de linfocitos T humanos, virus de Epstein-Barr, virus de leucemia murina, virus de las paperas, virus de la estomatitis vesicular, virus sindbis, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus que provocan verrugas, virus de la lengua azul, virus Sendai, virus de leucemia felina, reovirus, virus del polio, virus del simio 40, virus de tumor mamario del ratón, virus del dengue, virus de la rubéola, virus del Nilo occidental, Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Toxoplasma gondii, Trypanosoma rangeli, Trypanosoma cruzi, 60 Trypanosoma rhodesiense, Trypanosoma brucei, Schistosoma mansoni, Schistosoma japonicum, Babesia bovis,

Elmeria tenella, Onchocerca volvulus, Leishmania tropica, Trichinella spiralis, Theileria parva, Taenia hydatigena, Taenia ovis, Taenia saginata, Echinococcus granulosus, Mesocestoides corti, Mycoplasma arthritidis, M. hyorhinis, M. orale, M. arginini, Achleplasma laidlawii, M. salivarium y M. pneumoniae, tal como se describe en la patente de los Estados Unidos Nº 6.440.416.

- 5 En esta realización, la célula efectora inmune puede, por ejemplo, ser un neutrófilo.

La Figura 19 enumera específicamente los antígenos virales como objetivos para la IgM, IgA, IgG/IgM y los anticuerpos IgG/IgA en el presente documento, en combinación con marcadores de neutrófilos que pueden ser atacados por la cadena J modificada de dichos anticuerpos.

- 10 Se observa que los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA en este documento también pueden dirigirse a los antígenos de carbohidratos en los cánceres ricos en carbohidratos. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, CEA, CA-125, TADG78, Sialyl Lewis-X (CD 15).

15 En todas las realizaciones, el grupo funcional de unión (unidad de unión) utilizado para modificar una cadena J nativa puede introducirse antes o después de la cadena J. Por lo tanto, una cadena J modificada con especificidad de unión a CD3 puede tener una configuración anti-CD3_{scFv}-J o anti-CD3_{scFv}-J. La secuencia (SEQ ID NO: 46) y la estructura de un Fv monocatenario anti-CD3 que comprende la cadena J en el extremo C (anti-CD3_{scFv}-J) se muestran en la Figura 8. La secuencia (SEQ ID NO: 47) y la estructura de un Fv monocatenario anti-CD3 que comprende la cadena J en el extremo N (anti-CD3_{scFv}-J) se muestran en la Figura 9. Debido a su mayor avidez, tales anticuerpos son superiores a los anticuerpos IgG biespecíficos. Por ejemplo, como resultado, son adecuados para dirigirse a objetivos de bajo número de copias, como las células de linfoma de Burkitt resistentes a Rituxan caracterizadas por un bajo nivel de expresión de CD20. Además, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA en el presente documento que comprenden una cadena J modificada tienen una potencia mucho mayor en relación con los anticuerpos IgG biespecíficos.

Composiciones farmacéuticas de anticuerpos con cadena J modificada

25 Para usos terapéuticos, los anticuerpos que comprenden una cadena J modificada pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de la enfermedad o afección diana y los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención mediante ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con o coadministrar el compuesto con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y soluciones tampón acuosas. Los vehículos farmacéuticos incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica.

35 Las composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y/o agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar mediante procedimientos de esterilización y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

45 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico anterior del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

50 La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición sea entregable mediante jeringa. Además del agua, el vehículo es preferiblemente una solución salina tamponada isotónica.

55 Los siguientes ejemplos de secuencia de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar en la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos establecidos sin apartarse del espíritu de la invención, como se define en las reivindicaciones.

Otros detalles de la invención se ilustran mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

Preparación de un anticuerpo biespecífico anti-CDIM IgM que comprende un CD3 modificado de unión a la cadena J

1. Generación de construcciones de ADN con mutaciones diseñadas.

5 a. Síntesis de construcción de ADN. Todas las construcciones de ADN con mutaciones diseñadas son sintetizadas por los proveedores comerciales (Genescrypt), con sitios de restricción compatibles en ambos extremos para la subclonación en vectores de expresión respectivos.

10 b. Construcción de vectores de expresión. Las construcciones de ADN sintetizadas se vuelven a suspender en un tampón Tris-EDTA a 1 µg/ml. El ADN (1 µg) se somete a digestión enzimática y el gen sintetizado se separa del ADN plasmídico portador mediante electroforesis. El ADN digerido se liga a ADN plasmídico predigerido (pCAGGS para la cadena J, Gene 108 (1991) 193-200) mediante Técnicas estándar de biología molecular. El ADN ligado se transforma en bacterias competentes y se coloca en placas LB con múltiples antibióticos selectivos. Se recogen varias colonias bacterianas y se realizan preparaciones de ADN mediante técnicas estándar de biología molecular. Los ADN preparados se verifican por secuenciación. Solo se utilizan los clones bacterianos con una coincidencia del 100% de la secuencia de ADN con la secuencia de ADN diseñada para la preparación del ADN plasmídico y, posteriormente, para la transfección de células.

15 c. Diferentes cadenas J. Para demostrar que las variantes de la cadena J serán capaces de acoplarse con la IgM, se construirán dos variantes diferentes de la cadena J con distintos sitios de fusión que incorporan anticuerpo anti-CD3 (OKT3 scFv).

20 i. Esta construcción está compuesta por un scFv de OKT3 (anti-CD3) fusionado con el extremo N de la cadena J humana (CD3scFv-15 aa enlazador-J):

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSR
GYTNYNQKFKDATALTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYSLDYWG
QGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCSSSVSY
MNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYY
CQQWSSNPFTFGSGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGSQEDERIVLVNDNKCKCARITS
RIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPT
EVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVEATALT
PDACYPDGGGSEOKLISEEDLNSAVDHHHHHHH-

(SEQ ID NO: 46)

25 Esta construcción tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kD y es capaz de unirse a la cadena de épsilon soluble de CD3 (Sino Biological) o linfocitos T; y es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal anti-myc 4A6 u otros anticuerpos anti-myc.

ii. Esta construcción está compuesta por un scFv de OKT3 (anti-CD3) fusionado con el extremo C de la cadena J humana (J-15 aa Enlazador-CD3scFv):

QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTS
 PLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCY
 TAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPDGGSGGGSGGGGSQVQLQQSGAELAR
 PGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGGLEWIGYINPSRGYTNQNQFKDKA
 TLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCARYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGG
 SGGGSGGGGSQIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCASSSVSYMNWYQQKSGTSPK
 RWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGS
 GTKLEIKEQKLISEEDLNSAVDHBBBBB-

(SEQ ID NO: 47)

Esta construcción J-CD3scFv tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kD y es capaz de unirse a la cadena de épsilon soluble de CD3 (Sino Biological), o linfocitos T; y es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal anti-myc 4A6 u otros anticuerpos anti-myc.

- 5 d. Cadena pesada IgM: esta construcción de cadena pesada tiene una cadena μ de longitud completa para IGM-55.5 que se une a CDIM en la superficie de los linfocitos B:

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGFSGYYWSIRQPPGKGLEWIGEINHSG
 STNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGRMAWGASVNFDY
 WGQGTLVTSSGSASAAPTFLPVLSCENSPSDTS SVAVGCLAQDFLPDSITFSWKY
 KNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVKVQHPNGNKEK
 NVPLPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQ
 VGSGVTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQN
 ASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTYDSVTISWTRQNG
 EAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEEDDWNSGERFTCTVTHDLPSPLKQTIS
 RPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFWQWMQRGQPLSP
 EKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERV
 DKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

(SEQ ID NO: 3)

- 10 Esta construcción de cadena pesada tiene un peso molecular de aproximadamente 64 kD y cuando se coexpresa con la cadena ligera, la IgM resultante es capaz de unirse a los linfocitos B positivas CDIM. e. Cadena ligera para IGM-55.5 conocida como IGM-55.5, que se une a CDIM (molécula inductora de muerte celular) en la superficie de los linfocitos B:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
 SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGTRLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDSTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 5)

- 15 La construcción de la cadena ligera tiene un peso molecular de aproximadamente 24 kD y cuando se expresa conjuntamente con la cadena pesada apropiada (SEQ ID NO 3) es capaz de unirse a los linfocitos B positivas CDIM.

2. Expresión de proteínas, purificación y caracterización

- a. Transfección. El ADN de cadena J pesado, ligero y modificado se transfecta en células CHO. El ADN para los vectores de expresión se mezcla típicamente en una relación 1: 1: 1 con PEI y luego se agrega a las células CHO-S. La transfección de PEI con células CHO-S se lleva a cabo de acuerdo con las técnicas establecidas (ver "Biotechnology and Bioengineering, Vol. 87, 553-545").

b. Inmunoprecipitación

i. Captura seleccionada IgM (BAC, Thermo Fisher). Las proteínas IgM de los sobrenadantes de células CHO transfectadas se purifican parcialmente mediante inmuno-precipitación con la matriz de afinidad *Capture Select IgM* de acuerdo con el protocolo de los fabricantes (GE Life Sciences). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, la matriz de afinidad se separa del sobrenadante por centrifugación. La matriz se lava adicionalmente con PBS 3 veces antes de retirar cuidadosamente el PBS. La proteína capturada se eluye de la matriz mediante incubación con el tampón de proteínas NuPage LDS (Life Technology) durante 5 minutos.

ii. Matriz de afinidad de agarosa anti-myc (Sigma). Las proteínas IgM de los sobrenadantes de células CHO transfectadas se purifican parcialmente mediante inmunoprecipitación con una matriz de afinidad anti-myc de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, la matriz de afinidad se separa del sobrenadante por centrifugación. La matriz se lava adicionalmente con PBS 3 veces antes de eliminar cuidadosamente el PBS después del lavado final. La proteína capturada se eluye de la matriz mediante incubación con el tampón de proteínas NuPage LDS (Life Technology) durante 5 minutos.

c. Electroforesis en gel

i. SDS PAGE no reductor

ii. La SDS PAGE no reductora separa la IgM nativa y sus formas mutantes según el tamaño. La IgM pentamérica, compuesta por cadenas pesadas y ligeras homodiméricas, produce una banda de proteína de aproximadamente 1.000.000 de peso molecular. Se agrega NuPage LDS Sample Buffer (Life Technologies) a las muestras de proteínas IgM a 25 °C durante 30 minutos antes de cargarlas en el gel. Se utiliza NativePage Novex 3-12% Bis-Tris Gel (Life Technologies) con el tampón de ejecución Novex Tris-Acetate SDS (Life Technologies). Ejecute el gel hasta que el frente del tinte alcance la parte inferior del gel.

iii. Reducción de SDS-PAGE. El tampón de muestra NuPage LDS (Life Technologies) y el agente reductor de NuPage ditiotreitol (Life Technologies) se agregan a las muestras de proteínas IgM y se calientan a 80 ° C durante 10 minutos antes de cargarlas en el gel Bis-Tris NuPage 4-12% (Life Technologies). Se utiliza NuPage MES SDS Running Buffer (Life Technologies) para electroforesis en gel. Los geles se ejecutan hasta que el frente de tinte alcanza el fondo del gel. Una vez completada la electroforesis, se retira el gel del aparato y se tiñe utilizando Coloidal Blue Staining (Life Technologies).

iv. Detección Western Blot. Una vez completada la electroforesis, retire el gel de XCell SureLock Mini-Cell. Transfiera a la membrana de PVDF a 30 voltios durante 1 hora (consulte el manual de Life Technologies). Bloquear con 20 ml de BSA al 3% en PBST a 25°C durante 1 hora.

Para la transferencia Western de anti-cadena J, agregue anti-J (SP105, Thermo Fisher) a 1: 500 en BSA al 3% en PBST durante la noche a 4C. Lavar con PBST cuatro veces a temperatura ambiente. Agregue HRP-Cabra anti-conejo IgG (Jackson Immunology) a 1: 5.000 en BSA al 3% en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Lavar con PBST 4 veces a temperatura ambiente. Agregue 10 ml de sustrato quimioluminiscente HRP (Thermo Fisher) durante 10 minutos antes de exponer la mancha a la película. El anticuerpo anti-cadena J solo reacciona con IgM que se coexpresa con la cadena J no modificada (Figura 6) o la cadena J modificada (Figura 7).

Para el Western blot anti-myc, agregue anti-myc (4A6, Millipore) a 1: 200 en BSA al 3% en PBST durante toda la noche a 4C. Lavar con PBST cuatro veces a temperatura ambiente. Agregue HRP-Cabra anti-ratón IgG (Jackson Immunology) a 1: 5.000 en BSA al 3% en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Lavar con PBST 4 veces a temperatura ambiente. Agregue 10 ml de sustrato quimioluminiscente HRP (Thermo Fisher) durante 10 minutos antes de exponer la mancha a la película. El anticuerpo anti-myc solo reacciona con la cadena J modificada con la etiqueta myc (Figura 2).

3. Análisis bi-específico funcional

a. Análisis FACS de unión objetivo

Se confirma IGM-55.5 con CD3scFv-J o IGM-55.5 con unión de J-CD3scFv a los linfocitos T mediante la unión del anticuerpo a la línea de linfocitos T (Jurkat, línea celular CD3 positiva) y la línea de linfocitos B (Nalm6, línea celular de control negativo). Después del lavado, se añade a la suspensión celular rodamina marcada con 4A6. La unión a la diana celular es detectada por MFI de células de control positivo y negativo con o sin antígeno CD3.

Se confirma IGM-55.5 con CD3scFv-J o IGM-55.5 con unión de J-CD3scFv a células que expresan CDIM mediante la unión del anticuerpo a la línea celular positiva (Daudi, línea celular positiva) y la línea celular negativa (Peer). Después del lavado, se añade a la suspensión celular rodamina marcada con 4A6. La unión a la diana celular es detectada por MFI de células de control positivo y negativo con o sin antígeno CDIM.

b. EL análisis de FACS de la muerte de linfocitos B mediada por linfocitos T en co-cultivo

Se co-cultivó Raji, una línea de células CD19 + CD20 + B, con T-ALL, una línea de células citolíticas T CD8 + con CD20 IgM x J de tipo salvaje o CD20 IgM x CD3-J durante 24 horas a 37 grados, 5 % CO₂. Las células se recogieron y se sometieron a tinción con anticuerpos fluorescentes para CD3 (552852/BD Biosciences) y CD 19 (555413/BD Biosciences) y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar los linfocitos B viables.

5 c. Complemento de la citotoxicidad de los linfocitos B

Se cultivó Ramos, una línea celular CD20 + en placas de 96 pocillos de área media blanca a 25.000 células/pocillo. Se agregaron anticuerpo y complemento humano (5% final, Quidel) para iniciar la citotoxicidad dependiente del complemento y se midió el número de células viables utilizando Cell Titer Glo y el protocolo del fabricante. La luminiscencia se midió en un lector multimodo Envision (Perkin Elmer) utilizando un tiempo de integración de 0,1 s por pozo. El porcentaje de células viables se calculó normalizando los valores de luminiscencia (unidades de luminiscencia relativa - RLU) frente a los pocillos sin fármaco agregado. Los datos se analizaron con GraphPad Prism y un ajuste de cuatro parámetros con valores superiores e inferiores fijados a 100 y 0% de viabilidad respectivamente.

10 15 La unión multi-específica y el análisis funcional multiespecífico se pueden realizar de forma similar usando técnicas conocidas en la técnica, como las descritas anteriormente.

Ejemplo 2:

Clonación molecular, expresión y purificación de un anticuerpo biespecífico anti-CD20 IgM con una cadena J modificada que lleva un scFv de unión anti-CD3.

20 Este ejemplo describe la preparación de la clonación molecular, la expresión y la purificación de un anticuerpo IgM adicional que apunta a un antígeno celular B diferente (CD20) y una unión de cadena J modificada a CD3. El ADN correspondiente a las secuencias de cadena pesada y ligera a continuación se preparó utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 1.

SEQ ID NO: 48: secuencia de cadena ligera de IgM del anticuerpo anti-CD20 (rituximab)

```
MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWYATSNL  
ASGPVPVRFGSGSGTTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT  
ASVVCLNNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKKVYACEVTHQGLSSP  
VTKSFNRGEC
```

25 SEQ ID NO: 49: secuencia de cadena pesada de IgM del anticuerpo anti-CD20 (rituximab)

```
MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTGRGLEWIGAIYPGNG  
DTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCARSTYYGGDWYFNWAGTTVTVSSGSASAPTLFP  
LVSCENSPTSDTSSAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEH  
VVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVPPRGFFGNPRSKKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVT  
TDQVQAEAKESGPTTYKVSTTLTIKEDWLSQSMFTCRVDHRLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIF  
LTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDNSGERFTCTVTHSDL  
PSPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPE  
PQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

Se cotransfectaron el ADN correspondiente a estas cadenas pesadas y ligeras, así como el correspondiente a las secuencias de la cadena J de tipo salvaje (wt), O15J o J15O descritas en el Ejemplo 1 en células HEK293 y se expresaron y purificaron las proteínas utilizando la resina de camélido como se describe anteriormente. Como se muestra en la Figura 13, las cuatro proteínas se expresan bien. El hexámero anti-IgM CD20 sin cadena J se resuelve claramente a partir de los pentámeros que contienen cadena J para el pentámero IgM con la cadena J de tipo salvaje, así como para los IgM biespecíficos donde el scFv anti-CD3 está vinculado a la cadena J en cualquiera

30 de las orientaciones (O15J o J15O).

Ejemplo 3:

35 Clonación molecular, expresión y purificación del anticuerpo biespecífico anti-CD20 IgM que comprende una cadena J modificada que lleva un scFv de unión anti-CD3 diferente

Para establecer que el ensamblaje de IgM biespecífica es factible con una cadena J modificada que porta un scFv anti-CD3 de una secuencia diferente a la utilizada en los Ejemplos 1 y 2, se realizó una cadena J que porta las regiones variables del anticuerpo Visilizumab (Nuvion). A continuación, se muestran las secuencias para dos cadenas J con el scFv correspondiente a Visilizumab (V) fusionado a la cadena J a través de un enlazador que contiene 15 aa en dos orientaciones diferentes: V15J y J15V.

SEQ ID NO: 50: secuencia de cadena J para V15J

```
MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSG
YTHYNQKLKDATALTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGSG
GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDF
LTISLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRS
SEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSLRTRFVYHSDLCKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATET
CYTYDRNKCYTAVVPLVYGETKMVETALTPDACYPD
```

SEQ ID NO: 51: secuencia de la cadena J para J15V

```
MKNHLLFWGVLAFFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISD
TSPLRTRFVYHSDLCKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGETKMVETA
LTPDACYPDGGSQGGGGGGGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYI
NPRSGYTHYNQKLKDATALTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQGTLTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK
```

- 5 Como se describe en el Ejemplo 1, el ADN correspondiente a estas secuencias se sintetizó y se transfeció en células HEK293 junto con las cadenas pesada y ligera de IgM anti-CD20 para producir proteína que luego se purificó utilizando la matriz de afinidad de anticuerpos de camélidos específica para IgM. Como se muestra en la Figura 13, las cadenas J fusionadas al nuevo scFv anti-CD3 con el enlazador de 15 aa pueden incorporarse en la IgM y la forma pentamérica de IgM biespecífica con la cadena J correspondiente es claramente distinguible de la forma hexamérica sin una cadena J.
- 10

Ejemplo 4:

Clonación molecular, expresión y purificación de una IgM que comprende un camélido anti-CD 16 versiones de cadena J modificadas de un segundo dominio de unión a células efectoras - camélido anti-CD 16

- 15 Este ejemplo demuestra que es posible vincular un grupo funcional de unión diferente de un scFv a una cadena J, que se dirige a un objetivo diferente en una población de células efectoras diferentes. Se usó una secuencia Vhh de camélido que se muestra a continuación, que se seleccionó para unirse al antígeno CD 16 en linfocitos citolíticos naturales (linfocitos citolíticos naturales (NK)). Una vez más, esta secuencia se vinculó a una cadena J utilizando un enlazador flexible de 15 aa para producir C15J. La IgM biespecífica se expresó y purificó como se describe en el Ejemplo 1 y se analizó en geles híbridos. La formación de una especie pentamericana se ve claramente. Además, la incorporación de la cadena de C15J en la IgM pentamérica se estableció utilizando Western Blot (Figura 18). SEQ ID NO: 52: secuencia de la cadena J para C15J
- 20

```
MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGR
DTFYADSVKGRTFISRDNAKNTVYLQMSLKPEDTAVYYCAANPWPVAAPRSGYWGQGTQVTSSGGGGSGGG
SGGGSGQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSLRTRFVYHSDL
KKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGETKMVETALTPDACYPD
```

Ejemplo 5:

Análisis de la citotoxicidad dependiente del complemento para la familia de IgM con y sin cadenas J incorporadas

- 25 La citotoxicidad dependiente del complemento es un mecanismo clave para la muerte de anticuerpos por anticuerpos. Se sabe que los anticuerpos IgM tienen una muerte celular dependiente del complemento mejorada (CDC) debido a su forma multimérica. Un aspecto clave de esta invención fue probar si la incorporación de cadenas J modificadas, que portan scFv o ligantes Vhh de camélidos de células efectoras en sus extremos C- o N-, causa interferencia con la unión de C1q, el componente clave del complemento vía, y por lo tanto puede inhibir CDC.
- 30 Medimos la actividad de los CDC de cada una de las construcciones de IgM y de IgM biespecífica. Como se muestra en la Figura 14, encontramos que la incorporación de la cadena J modificada no tiene, inesperadamente, ningún efecto perjudicial sobre la actividad de los CDC de nuestras IgM biespecíficas. Además, con las longitudes del enlazador que probamos, encontramos que las IgM biespecíficas tienen actividad de los CDC entre 60 y 100 veces mejorada sobre la IgG correspondiente en una base molar (Figura 14).

Ejemplo 6:

Análisis de la destrucción de linfocitos B dependientes de linfocitos T por IgM biespecífica en co-cultivo *in vitro*

Se espera que la implicancia de los linfocitos T efectoras por los anticuerpos IgM biespecíficos con una cadena J modificada aumente en gran medida la destrucción de las poblaciones de linfocitos B diana en comparación con la IgM que no tiene cadena J o la cadena J de tipo salvaje. Para probar la muerte celular en co-cultivo, realizamos un ensayo de muerte celular como se describe en el Ejemplo 1. Anticuerpo a una alta concentración única (100 ng/ml) 5 incubado con células CD20 + Raji y linfocitos T-ALL efectoras CD3 +. Como se muestra en la Figura 15, la IgM biespecífica que lleva un scFv de unión a CD3 en su cadena J puede causar la destrucción completa de los linfocitos B. El mismo experimento realizado como respuesta a la dosis muestra que hay una mejora de más de 300 veces en la destrucción de linfocitos B en comparación con la IgM que no transporta scFv capaz de enganchar a los linfocitos T. La destrucción completa de linfocitos B por IgM biespecífica se observa en concentraciones tan bajas como de 10 10 ng/mL.

Ejemplo 7:

Demostración de la muerte de linfocitos B dependientes de linfocitos T in vivo en un modelo de ratón NSG

Con el fin de probar las IgM biespecíficas que produjimos en un contexto in vivo, realizamos experimentos con ratones humanizados no obesos diabéticos severos combinados inmunodeficientes en gamma (NSG). Estos ratones tienen una función inmune severamente dañada y carecen de linfocitos T y B de ratón. Se reconstituyen con células madre CD34 + humanas para crear ratones con poblaciones de linfocitos esencialmente humanos. Cuando se administró la cadena CD20 IgM x CD3-J por vía intravenosa en estos animales a 0,5 mg/kg y se obtuvo sangre completa y se analizó mediante citometría de flujo para determinar los niveles circulantes de linfocitos B humanos, 15 se observó un agotamiento completo de la población de linfocitos B incluso con tratamientos tan breves como de 6 horas (Figura 17).

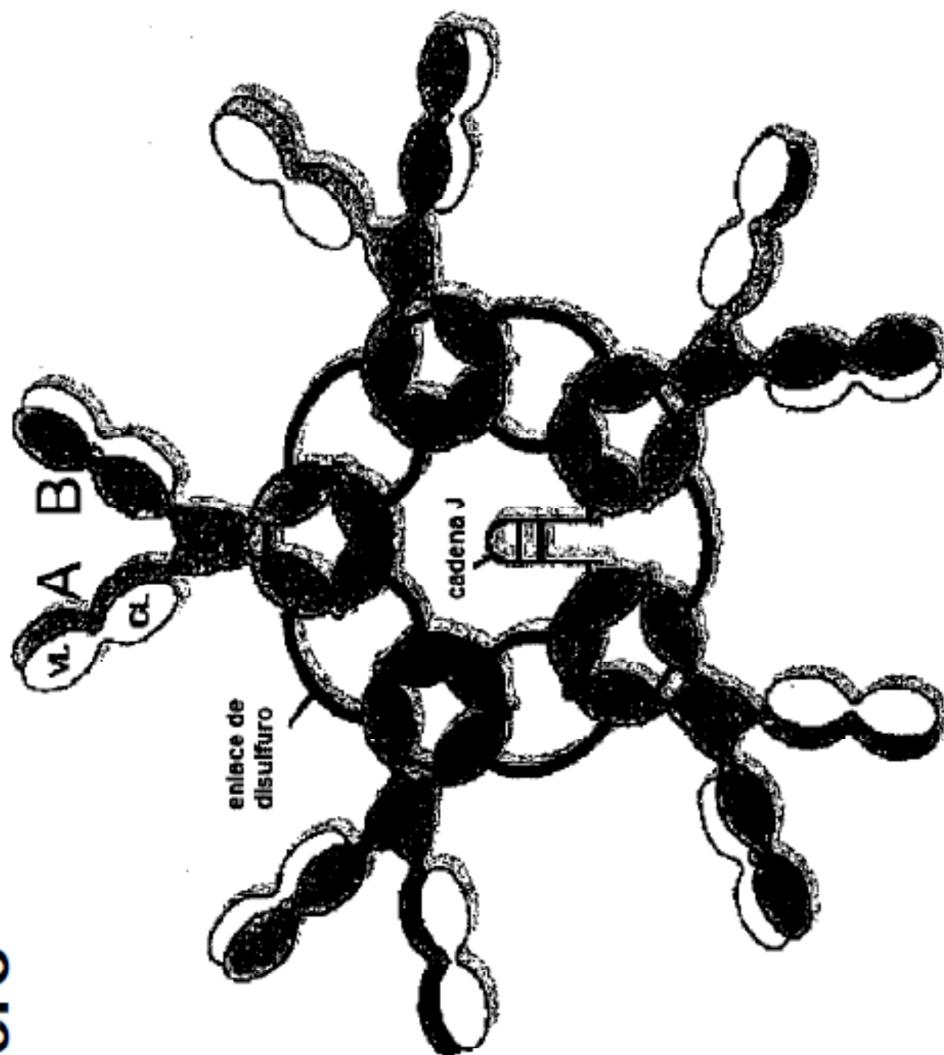
Si bien se han proporcionado varias realizaciones en la presente divulgación, debe entenderse que los sistemas y métodos divulgados podrían incorporarse en muchas otras formas específicas sin apartarse del espíritu o alcance de la presente divulgación. Los presentes ejemplos deben considerarse como ilustrativos y no restrictivos, y la intención 20 no debe limitarse a los detalles que se dan en este documento. Un entendido en la técnica puede determinar varios ejemplos de cambios, sustituciones y alteraciones que podrían realizarse sin apartarse del alcance de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, y la protección conferida por ello, según lo determinado por las reivindicaciones de acuerdo con Artículo 69 EPC y el Protocolo sobre la Interpretación del Artículo 69 EPC.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA que comprende una cadena J modificada, en donde la cadena J modificada comprende un grupo funcional de unión extraña introducido en una cadena J de secuencia nativa, y en donde dicha IgG/IgM o El anticuerpo IgG/IgA es un anticuerpo híbrido que contiene una pieza de cola IgM o IgA en la cadena pesada de IgG y tiene la capacidad de incorporar y formar polímeros con la cadena J modificada.
- 10 **2.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de la reivindicación 1, en el que la secuencia J de cadena nativa es la secuencia de la cadena J humana nativa de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento funcional de la misma.
- 15 **3.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el grupo funcional de unión extraña es un polipéptido introducido en la secuencia de la cadena J humana nativa de la SEQ ID NO: 1, mediante fusión directa o indirecta, y en la que el grupo funcional de unión extraño se introduce opcionalmente mediante fusión indirecta a través de un enlazador peptídico en o alrededor de un extremo C y/o un extremo N del grupo funcional de unión extraño, opcionalmente dentro de aproximadamente 10 residuos del C y/o N-terminal, y en el que dicho enlazador peptídico tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos.
- 20 **4.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo funcional de unión extraña se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa entre los residuos de cisteína 92 y 101 de la SEC ID. NO: 1 por fusión indirecta a través de un enlazador peptídico.
- 25 **5.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo funcional de unión extraña se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa de la SEQ ID NO: 1 en o cerca de Sitio de glicosilación por fusión indirecta a través de un enlazador peptídico.
- 30 **6.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de la reivindicación 1, en el que el grupo funcional de unión extraño se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa de la SEQ ID NO: 1 mediante derivación química o quimioenzimática, opcionalmente por un enlazador químico escindible o no escindible, en donde el enlazador escindible es opcionalmente un enlazador químicamente lábil o un enlazador enzimático lábil, y donde el enlazador escindible o no escindible se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), N-succinimidil-4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), iminotiolano (IT), bifuncional derivados de imidoésteres, ésteres activos, aldehídos, compuestos bis-azido, derivados de bis-diazonio, diisocianatos y compuestos de flúor activos.
- 35 **7.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA de la reivindicación 6, en el que la cadena J modificada se modifica mediante la inserción de un sitio de reconocimiento enzimático, y mediante la unión posterior a la traducción de un grupo funcional de unión extraña en el reconocimiento enzimático sitio a través de un péptido o enlazador no peptídico.
- 40 **8.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el grupo funcional de unión extraña se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos que se unen al antígeno, conjugados de anticuerpo-fármaco , moléculas similares a anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de moléculas similares a anticuerpos, proteínas solubles y unidas a membrana, ligandos, receptores, partículas similares a virus, toxinas de proteínas, enzimas y estructuras alternativas, en donde dicho andamio alternativo se selecciona opcionalmente de grupo que consiste en: darinas, dominios de fibronectina, adnectinas y nudillos, y en el que dicho grupo funcional de unión extraña es opcionalmente un fragmento de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste en: F(ab') 2, F(ab) 2, Fab', Fab, Fv, scFv y anticuerpo de dominio único.
- 45 **9.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el grupo funcional de unión extraña se une a una célula efectora, en donde la célula efectora se selecciona del grupo que consiste en: linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos y neutrófilos.
- 50 **10.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de la reivindicación 9, en el que la célula efectora es un linfocito T, y en la que el grupo funcional de unión extraña se une a un polipéptido CD3ε en el linfocito T.
- 55 **11.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de la reivindicación 9, en el que la célula efectora es un linfocito citolítico natural, y en la que el grupo funcional de unión extraña se une a un objetivo seleccionado del grupo que consiste en CD16, CD64 y NKG2D en el linfocito citolítico natural.
- 60 **12.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende una pluralidad de restos de unión extraños.
- 65 **13.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el anticuerpo receptor de la cadena J modificada es monoespecífico, biespecífico o multiespecífico.
- 70 **14.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que se une a una célula cancerosa hematológica o una célula tumoral sólida, en donde el anticuerpo se une a uno o más de CD11, CD19, CD20, CD22, CD33, CD70, CD56, CD138.

- 15.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de la reivindicación 14, en el que el anticuerpo se une a CD20 y el grupo funcional de unión extraña en la cadena J modificada se une a CD3ε.
- 16.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que se une a un antígeno viral, en donde el antígeno viral es un antígeno PreS1 del VHB o un antígeno gp120 del VIH.
- 5 **17.** Una composición que comprende el anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que es opcionalmente una composición farmacéutica, que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 18.** El anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, o la composición de la reivindicación 17, para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad viral.

Pentámero
IgM



Cinco unidades (A,B), A=B en IgM natural

FIG. 1

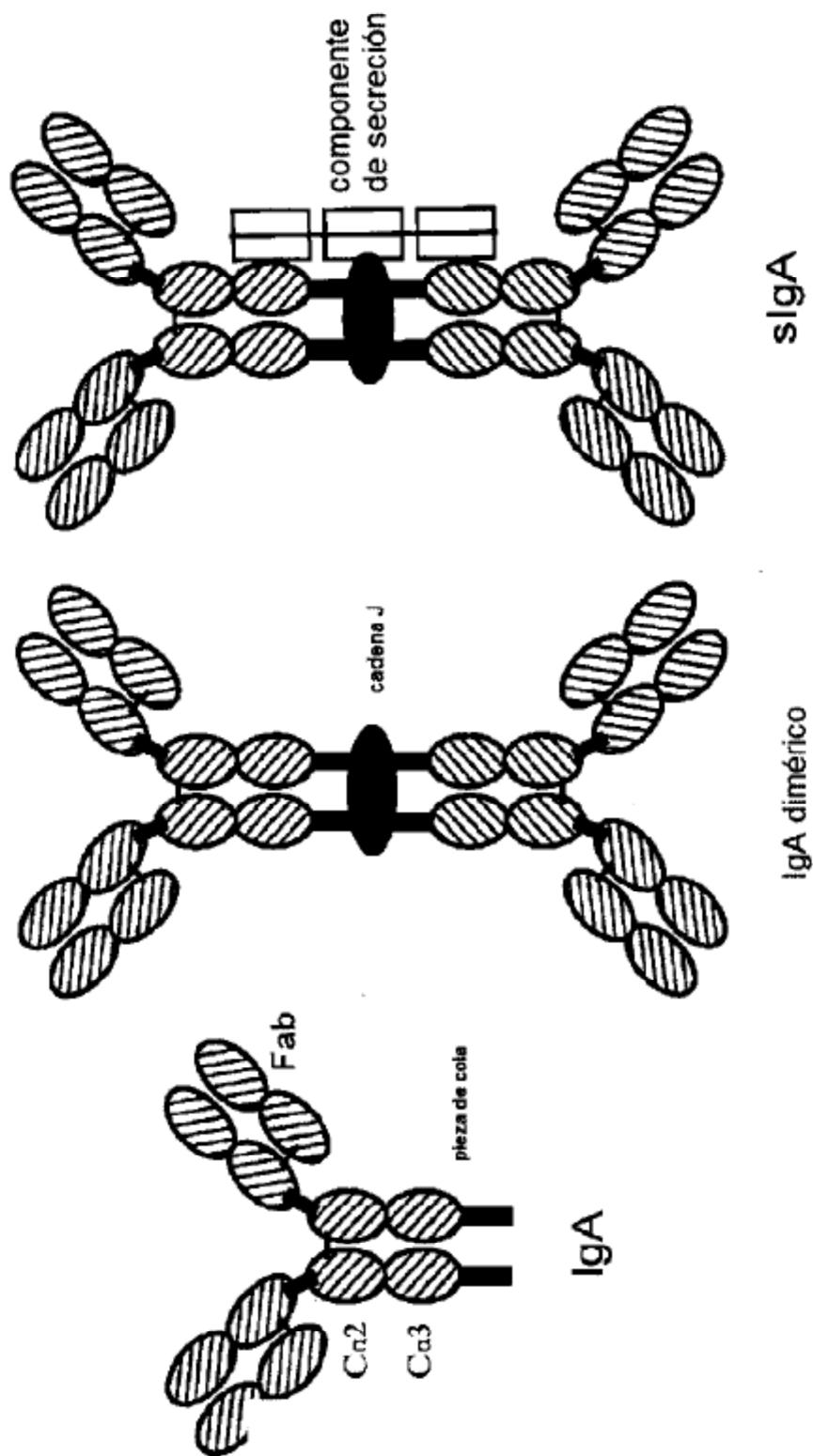


FIG. 2

Cadena J humana madura

- **QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNI
RIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHSDLCKKCDPT
EVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYT
AVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD (SEQ ID NO:
1)**
- Cantidad de aminoácidos: **137**
- Peso molecular : **15594.4**
- PI teórico : **4.59**

FIG. 3

Hum = Human NP_653247 23-159
 Chm = Chimpanzee XP_001160135 39-175
 Gor = Gorilla XP_004038830 23-159
 Ora = Orangutan NP_001125381 23-159
 Gib = Gibbon XP_003265761 39-175
 Mar = Marmoset XP_003732538 32-168
 Cyn = Cynomolgus Monkey NP_001247815 23-159
 Bab = Baboon XP_003898844 23-159
 Squ = Squirrel Monkey XP_003931978 23-159
 Shr = Tree Shrew XP_006142955 25-160
 Dol = Dolphin XP_004328961 25-158
 Kil = Killer Whale XP_004283629 25-158
 Ele = Elephant XP_003414110 25-158
 Sea = Seal XP_006729388 25-158
 Rhi = Rhinoceros XP_004419202 25-157
 Cat = House Cat XP_003985350 25-158
 Wol = Wolf XP_532398 26-159
 Pan = Giant Panda EFB23253 1-134
 Fer = Ferret XP_004766376 26-158
 Hor = Horse NP_001271464 25-158
 Gui = Guinea Pig NP_001265705 25-160
 Cam = Camel XP_006188738 25-158
 Goa = Goat XP_005681786 25-158
 Chn = Chinchilla XP_005392838 94-229
 Ham = Hamster XP_005068228 24-160
 She = Sheep XP_004009937 25-158
 BBa = Brown Bat XP_006094475 25-158
 Ant = Antelope XP_005983836 25-158
 Cow = Cow NP_786967 25-157
 Mou = Mouse NP_690052 23-159
 Rat = Rat EDL88516 23-159
 Hed = Hedgehog XP_004703237 25-157
 Rab = Rabbit P23108 1-136
 Opo = Opossum XP_003341415 29-162
 All = Alligator XP_006270094 26-159
 Tur = Turtle XP_005304167 26-159
 Tas = Tasmania Devil XP_003772863 27-160
 Pla = Platypus XP_003430954 36-160
 Par = Parakeet XP_005142787 28-160
 Duc = Duck XP_005031370 28-160
 Chi = Chicken NP_989594 26-158
 Tur = Turkey XP_003205717 27-159
 Fal = Falcon XP_005243236 29-160
 Spa = Sparrow XP_005492217 29-158

FIG. 4

	1 23	10 30	20 40	30 50	40 60	50 70	60 80	90 HLS DLC
Hum	QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLS DLC							
Chm
Gor
Ora
Gib	H.
Mar	N.	K.
Cyn	..G.	K.
Bab	..G.	K.
SquA.	NN.	V.	K.
Shr	..KGT.QV.	P.P.Q.	G.	K.
DolT.	P.A.	...SQ.	S.	K.
KilT.	P.A.	...SQ.	S.	K.
Ele	K.. TL.V.	P.K.	...SQ.	K.
Seal	..G.T.Q.	P.P.N.	V.. K.
Rhi-V.P.P.	H.. V.Q.
CatT.V.V.P.A.	N.V.
Wol	.E..T.Q.	P.PD.	V.. K.
Pan	..G.T.Q.P.P.	V.. K.
Fer	..GMT.	A.. Q.V.P.P.I.	V.. N.
Hor	..G....A.V.V.P.P.N.L.. H..	I.V.S.	V.. K.
Gui	.E..T..A.Q.. V.. V..NPDN.	V.. H..S.	K.
Cam	...ST.	P.P..	...SQ.	K.E.
Goa	.N.	P.A..	...SQ.	S.	M.. K.
Chn	..EKKTI.	A.. Q.. VS.. V.. P.N.	Y..	V..	R.. Q..
Ham	DN.KTI.	A.. M.T.V.T.N.	V..	K.
She	.N.	P.A..	...SQ.	S.	M.. K.
BBaT.. A.V.. V.. P.PD.	TQE.	V..	K..	EM..
Ant	.N.	P.A..	...SQ.V..	S..	M.. K.
Cow	.N.. -	P.A..	...SQ.V..	S..	M.. K.
Mou	D.. ATI.	A.. M.T.V.P.T.	V..	RN..V.
Rat	DNKGTI.	A.. M.T.P.P.	S.. V..	V.. N..V.
Hed	K.. GT..V.V.A.S.P.T..	E.L.K..GS..	N.. V.. T..	MT.. Y
Rab	...ST.Q.V..DPDN.	S..	T..	E.K.N.AN..
Opo	...GRI..V.V.. LVP.	KDN.	E.KV..L.. R..	V..R..
All	E.W.EH..Q.V.V.. KFVP.	KDN.	Q.E.L..	V..	KS.M..	T.. R.. E..
Tur	E.A.EH..V.. KFVP.	KDN.	Q.. EVLV..	V..	LS.K..	V.. T.. R.. E..
Tas	...GRI..Q.V.V.. LVP.	KDN.	EVEV..L.. K..	N.. V.. N.. R.. N..
PlaT.V.. KFVP.	K.. SVKVL..V.I.. KA.Q..	P..E.. K..
Par	..MER..	N.. Q.. VTV..	KLV..	K.N.. E.. LQ..L.. KA..	L..T.. RMT..
Duc	DG.ER..	N.. TTV..	LVP.	K.N.. D.. E.. L..T.. RS.Q..	T..	RMAE..
Chi	DG.ER..	N.. VTV..	KFVP.	KDN.. E.. EVL..	KS..	T.. RMTE..
Tur	DG.ER..	N.. VTV..	KFVP.	KDN.. E.. EVL..	KS.Q..	N.. RMTE..
Fal	..DEH..	N.. Q.. VTV..	KFVP.	K.. G.. EVL..L.. RA..M..T..	RMTE..
Spa	..EY..	N.. Q.. VTV..	KFVP.	Q.. N.. Q.. EVL..KA..L..T..	R.. E..

FIG. 4 (Cont.)

	70	80	90	100	110	120	130	140	150
	100	110	120	130	140				
Hum	KKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSAT-ETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGTAKMVEATALTPDACYPD								
Chm	R.				
Gor		K.			
Ora	I.		A.			
Gib	I.	L.				
Mar	F.	S.	S.		
Cyn	T.	Q.	S.		
Bab	L.	T.R.	Q.	S.		
Squ	T.	F.	KAT.	S.	
ShrL.	TM.	IF.	K.	Q.	S.
Dol	...L.	V.	I---	NR.	T.	K.		S.
Kil	...L.	V.	I---	NR.	T.	K.		S.
EleV.	V.	---	NT.	I.	K.	T.	S.R.
SeaV.	V.	I.S.	L.	NW.	FT.	Q.		S.
Rhi	V.	I..A.	NR.	T.	V.		S.
CatV.	M.S.	E.--.	NR.	FT.	V.R.		S.
WolLV.	V.I.S.	L.	T---	NR.	IM.	Q.		S.
PanV.	G.	I.S.	L.	NR.	FT.	Q.R.		S.
FerV.	I.S.	L.	NW.	FT.	Q.	S.	
HorV.	V.	S.	E.--.	A.	NR.	T.	Q.	S.
GuiV.	D.V.	L.ED.REP-	N.	S.	K.L.TA.	S.
CamL.	G.RV.	L.D.I---	NK.	FT.D.		S.
GoaTR.	ED.V.	S.	R.T---	NR.K.N.R.Q.			S.
ChnV.	N.	V.	L.E..GEP-	A.N.	T.	P.KV.	S.A.
HamV.	DH.	S.	T.S.	VVP.	M.N.	M.	T.R.	PS.
SheTR.	ED.V.	S.	R.T---	NR.K.N.R.Q.	L.		S.
BBaT.Q.	E.	V.	N--	NK.	FS.	K.V.
AntR.	TR.	ED.V.	S.	R.T---	NR.K.N.R.Q.		S.
CowT.	ED.V.	S.	S.A--	NR.K.S.R.Q.			S.
MouV.	ED.V.	N..DGVP.	M.	TM.	R.H.	QA.	S.
RatV.	ED.V.	SG..GVP.	M.	M.	R.H.	Q.
HedV.V.	G.	N.	T.	K.Y.R.	S.
Rab	I.	VF.	S.	PD.DYS-	TL.	ITHR.G.R.	KAT.
Opo	L.	N.EV.	N..DT.	---	STAA.	YLE..RL.T.	ES..N.
All	I.	GG.Q.	TD.SKS	---D.	TTF.FA..Q.	NI.A..AS..A.
Tur	GDRV.	E..N.	SSS	---D.	TTF.FF..	KINT.QA.	ES..A.
TasR.	I.L.	G.E.	NWSCG	-----	STAL.DL.	KST..T.	ES..S.
Pla	Q...Q.HEV.	RG.S.	RPG	--DD.	MSTI.FT.	V.N.V..ES..
ParV.F.	GGE.	YK.Q.	S..P	----	D.	TNF.FL.H.	NLQAV..AS..A.
DucV.	GGE.	YE.Q.	TS.N.P	----	N.D.	TTF.FI.H.	HIQA..AS..A.
ChiV.I.	GGETYQ.	Q..S.	N.P	----	N.D.	TTF.F..H.	HIQA..TS..AE
TurV.I.	GGETYQ.	Q..TS.	N.P	----	N.D.	TTI.F..Q.	QIQA..AS..A.
FalV.	GGE.	YK.Q.	TS.N.P	----	N.D.	TTF.FS.H.	V.K.QAV..AS..A.	
SpaN.E.I.ID.GGA.	HQ.Q.G.S.E.P	----	Q.	E..SSP..LHH..VMQ.PA.	S.F	

FIG. 4 (Cont.)

Cadena J humana comp. con cadena J murciélagos

Problema 2	EDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRI----- 41
	EDERI+LVDNKCKCARITSRII S EDP++DIVERNIRI
Sujeto 25	EDERILLVDNKCKCARITSRIIPS PEDPSQDIVERNIRIKLGDEKSMVNWLWNCKLLCTAG 84
Problema 42	-----VPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKCDPTEVELDNQIVTA 86
	VPLNNRENISDPTSP RT FVYHLSDLCK CDPTEVELDNQ+VT
Sujeto 85	LQSKEGGMVADTAGKVPLNNRENISDPTSPRTNFVYHLSDLCKNCDPTEVELDNQVVTV 144
Problema 87	TQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGETKMVEATALTPDACYPD 137
	TQSNICDED+ ETCY YDRNKCYT VPL+YGG+T MVEATALTPD+CYPD
Sujeto 145	TQSNICDEDN--ETCYAYDRNKCYTNRVPLLGGKTIMVETALTPDSCYPD 193

FIG. 5

Tinción con Coomassie Análisis de western blot anti-J

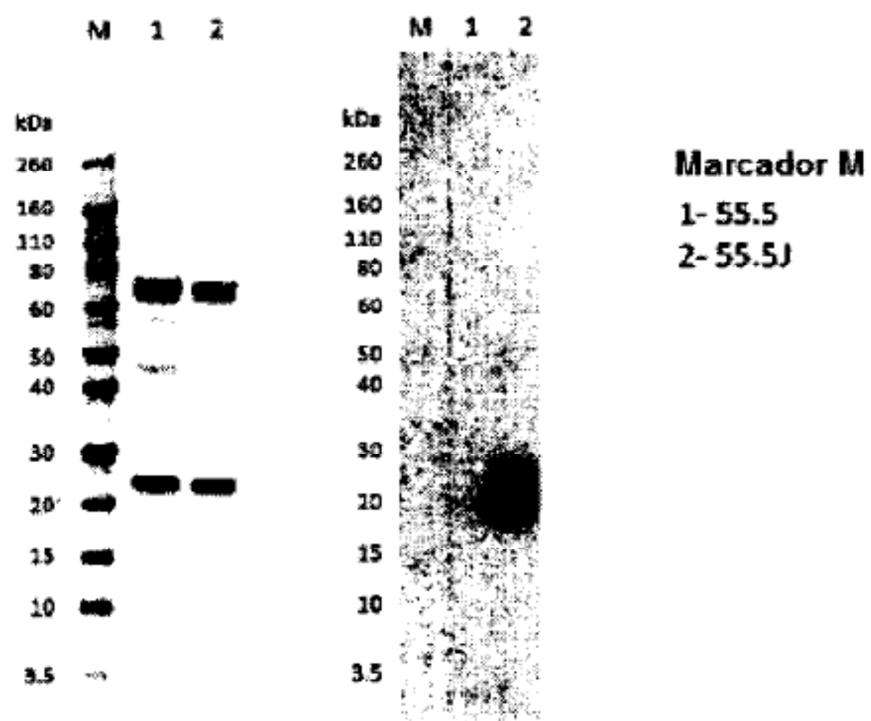
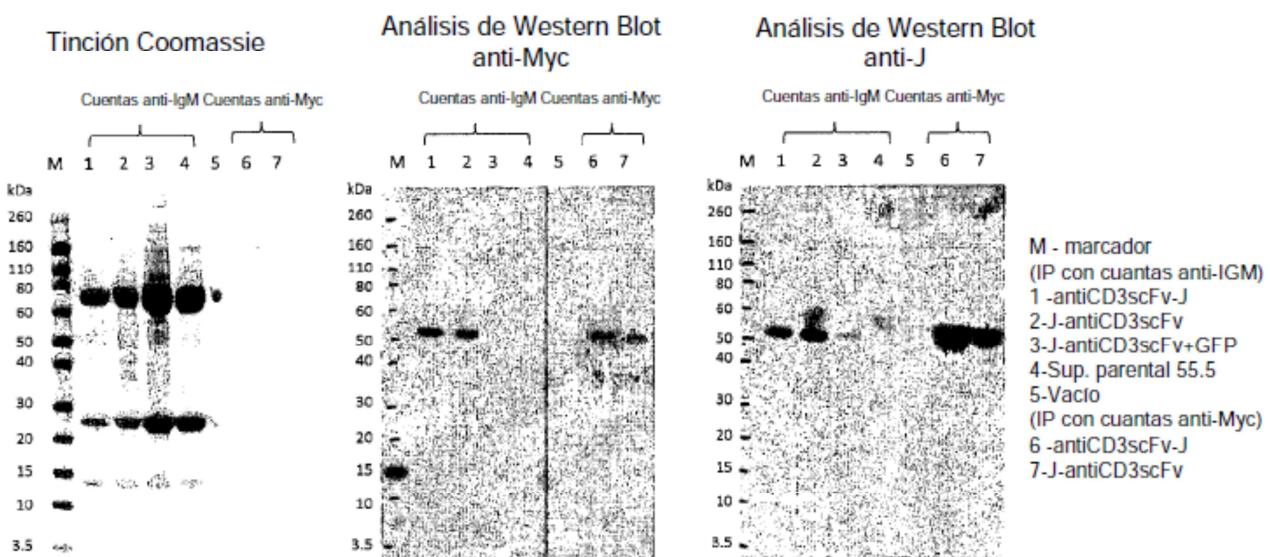


FIG. 6

**FIG. 7**

Orientación de estructuras de cadena J

J- α CD3:

cadena J en el extremo N

scFv αCD3 en el extremo C



α CD3-J:

scFv αCD3 en el extremo N

cadena J en el extremo C



FIG. 8

antiCD3scFv-J

- MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLQQSGAELARP GASVKMSCKASGYTFTR
YTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKD~~K~~ATLTTDKSSSTAYM
QLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYSLDYWGQGT~~TL~~TVSSGGGGSGGGGSGG
GGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCASSSVYMNWYQQKSGTSPKRWI
YDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTF
GSGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGQEDERIVLV~~DNKCKCARITSRIIRSS~~
EDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTE
VELDNQIVTATQSNICDEDSATE~~T~~CYTYDRNKCYTAVVPLVYGETKMVE
TALTPDACYPDGGGSEQKLI~~SEEDL~~NSAVDHHHHHH-

**FIG. 9**

J-antiCD3scFv

- MKNHLLFWGVLA~~VFIKAVHVKA~~QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSED
PNEDIVERNIRIIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVE
LDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGG**E**TKMVETA
LTPDACYPDG~~GGG~~S~~GGG~~S~~GGG~~S~~GGG~~SQVQLQQSGAELARP GASVKMSCKASG
YTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNQNQFKDKATLTTDKSS
STAYMQLSSLTSED~~SAVYYCARYYDDHYS~~LDYWGQGTTLVSSGGGS~~GG~~
~~GGSGGGGS~~QIVLTQSPAIMSASPGEKVMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTS
PKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSS
NPFTFGSGTKLEIKGGGSEQKLISEEDLN~~SAVD~~HHHHHH-



FIG. 10

Pentámero de IgM asimétrico con cadena J modificada

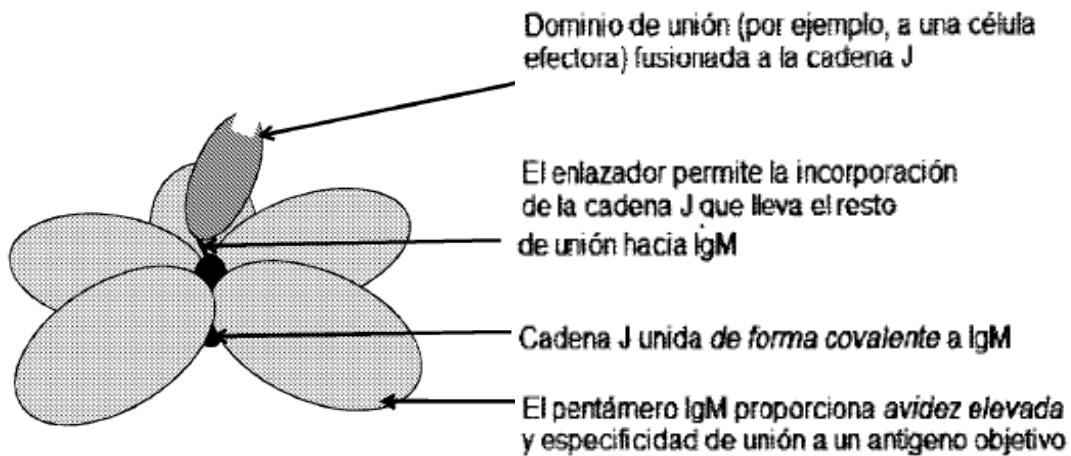
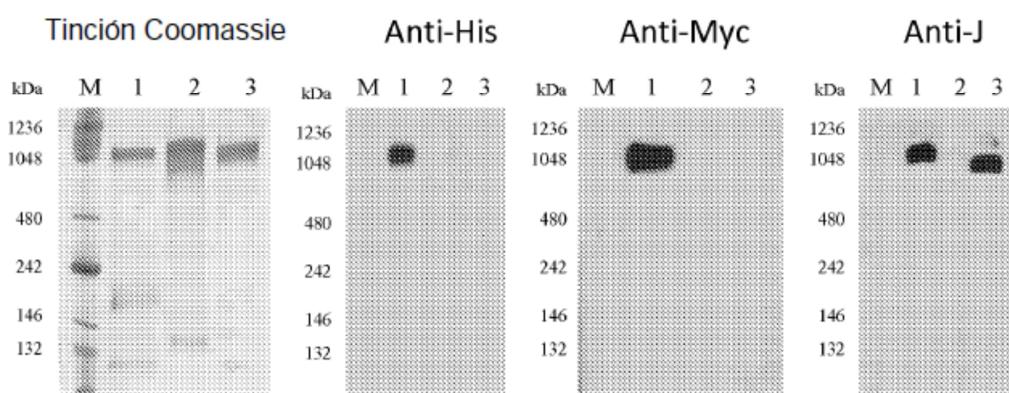


FIG. 11

Cadena J modificada con α CD3 scFv incorporada en
pantámero α CD20 IgM



Marcador M
1) IgM + α CD3- cadena J
2) 55.5 IgM
3) 55.5 IgM + J de tipo salvaje

FIG. 12

α CD20_{IgM} x α CD3_J de expresión IgM biespecífica

- Contransfecciones transitorias: HC, LC y JC
- Todas las 5 variantes J son parámetros

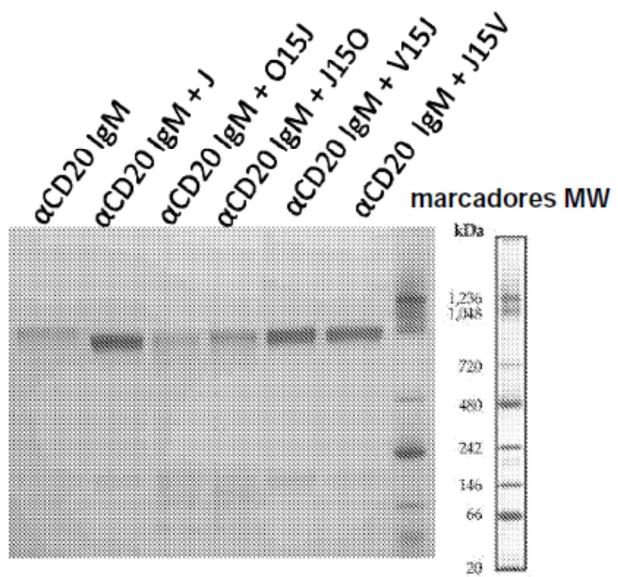
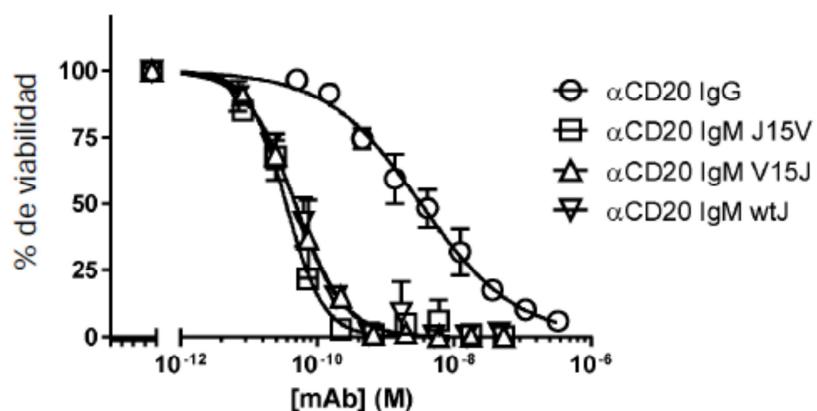


FIG. 13

Las variables V15J/V15V conservan la actividad CDC



EC50(pM)			
α CD20 IgG	α CD20 IgM wtJ	α CD20 IgM V15J	α CD20 IgM J15V
3292	48.4	47.9	35.2

FIG. 14

IgM biespecífica: destrucción de linfocitos T activos de linfocitos B de α CD20_{IgM} x α CD3_{cadena-j} altamente potente en el agotamiento de los linfocitos B

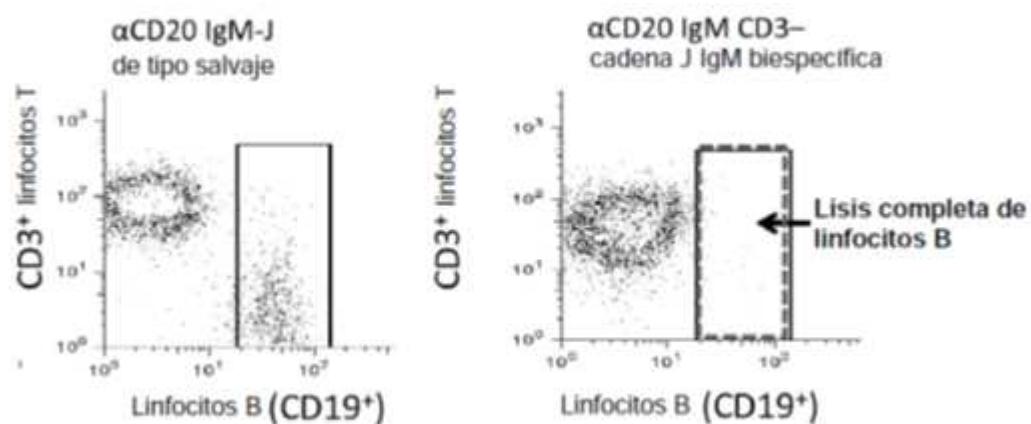


FIG. 15

IgM biespecífica: destrucción α CD20 muy activa con células Raji
(linfocitos B) de linfocitos T con α CD20 x α CD3 IgM

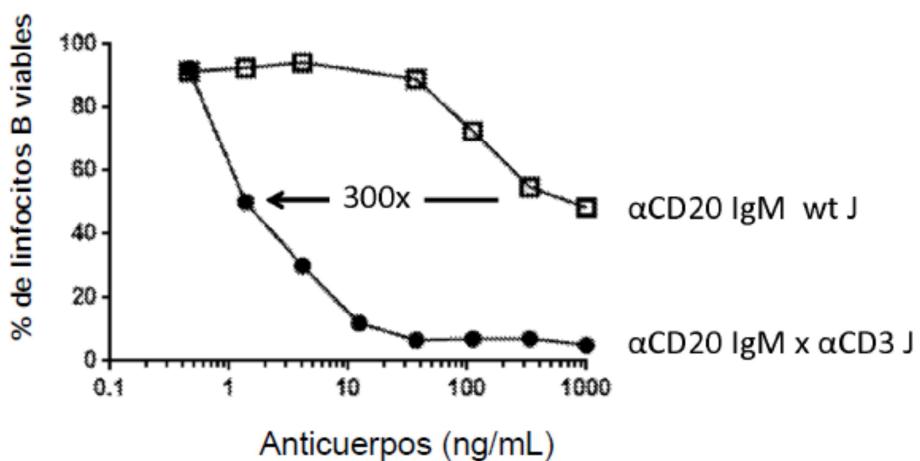


FIG. 16

**Reducción muy activa de linfocitos B in vivo con IgG
anti-CD20, IgM e IgM biespecífica**

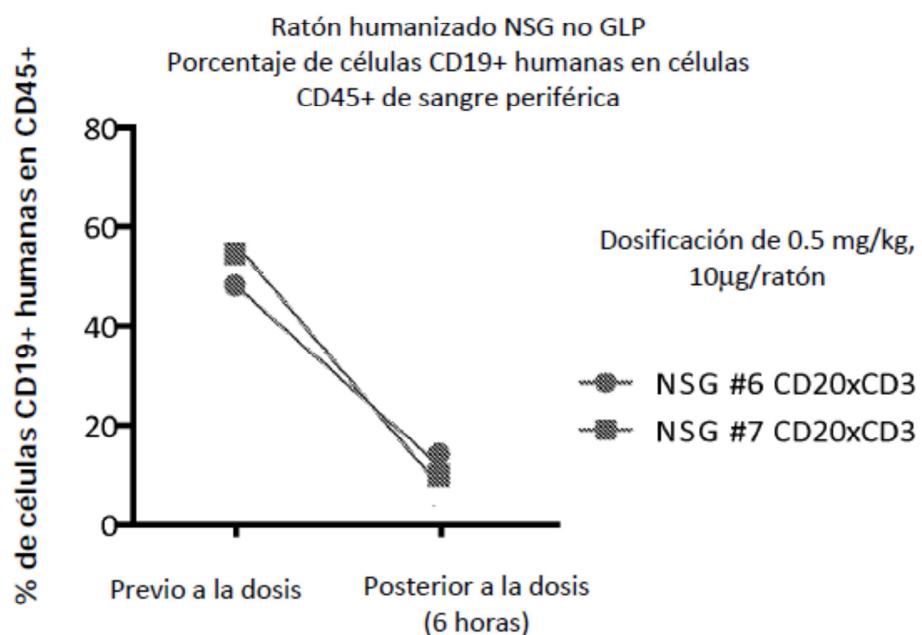


FIG. 17

CD 16 de cadena J camélida Vh específica

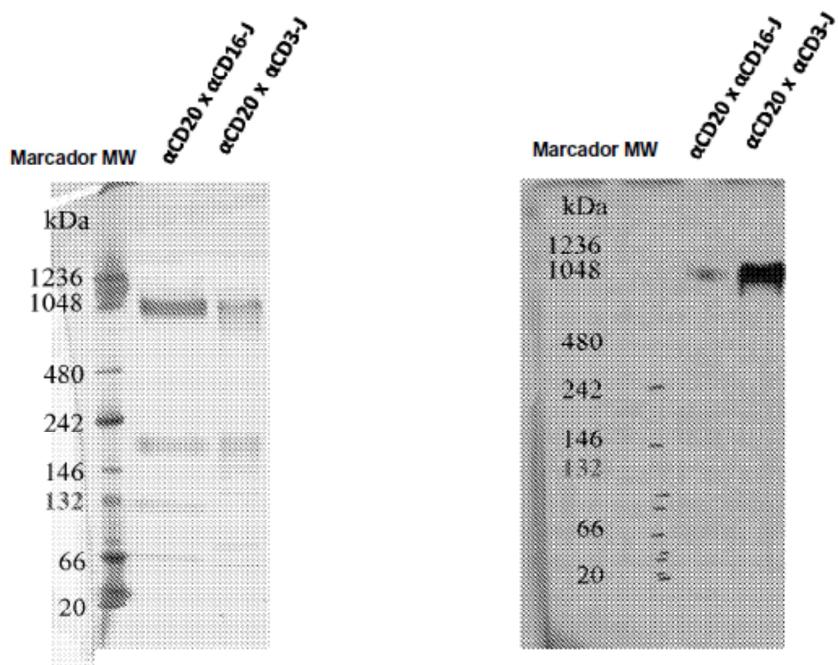


FIG. 18

Enfoque de tipo menú para Abs biespecíficas
Células objetivo x células efectoras: para usos oncológicos

Antígeno asociado al objetivo	Célula efectora inmune
<p>Cáncer hematológico CDIM, CD19, CD20, CD22, CD33, CD70, CD56, CD138</p> <p>Tumor epitelial EpCAM, Her2, Eph-A2 PSMA, MCSP, AGS-5 GPNMB</p> <p>Antígenos de carbohidratos CEA, CA-125, TAG78 Sialyl Lewis-X (CD15)</p> <p>Antígenos virales PreS1 (HBV), GP120 (HIV)</p>	<p>Linfocitos T CD3 epsilon</p> <p>Linfocitos citolíticos naturales, CD16, CD64 NKG2D</p> <p>macrófagos CD14</p> <p>neutrófilos CD16b, CD177</p>

FIG. 19