

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 996 834**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2016** **PCT/US2016/055041**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017** **WO17059380**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2016** **E 16784320 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024** **EP 3355913**

54 Título: **Moléculas de unión con cadena j modificada**

30 Prioridad:

30.09.2015 US 201562235518 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2025

73 Titular/es:

IGM BIOSCIENCES, INC. (100.00%)
325 East Middlefield Road
Mountain View, CA 94043, US

72 Inventor/es:

KEYT, BRUCE;
PRESTA, LEONARD GEORGE y
BALIGA, RAMESH

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 996 834 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

Moléculas de unión con cadena j modificada

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a moléculas de unión que comprenden un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que comprende una cadena J modificada.

10 Antecedentes de la invención

La cadena J es un polipéptido de 15 kDa ácido, que está asociada con la IgM pentamérica y la IgA dimérica a través de enlaces disulfuro que implica al penúltimo residuo de cisteína en la pieza de cola secretora (tp) de 18 aminoácidos en el extremo C-terminal de la cadena pesada IgM μ o IgA α . Los tres puentes disulfuro se forman entre Cys 12 y 100, Cys 71 y 91, y Cys 108 y 133, respectivamente. Véase, *por ejemplo*, Frutiger et al. 1992, Biochemistry 31, 12643-12647. Los requisitos estructurales para la incorporación de la cadena J en IgM e IgA humana y para el conjunto de inmunoglobulina polimérica y la asociación con la cadena J son notificados por Sorensen et al. 2000, Int. Immunol. 12(1): 19-27 y Yoo et al. 1999, J. Biol. Chem. 274(47):33771-33777, respectivamente. La producción recombinante de cadena J soluble en E coli es informada por Redwan et al. 2006, Human Antibodies 15:95-102 los constructos de cadena J recombinante también se describen en el documento WO 98/30591 A1 (EpicYTE Pharmaceutical Inc).

Los métodos para hacer anticuerpos de IgA/IgG e IgM/IgG híbridos son conocidos en la técnica. Por tanto, la producción recombinante de anticuerpos de IgA2/IgG1 híbridos se notifica en Chintalacharuvu et al. 2001, Clin Immunol 101(1):21-31. Se ha notificado que la adición de atp o jtp al final de la cadena pesada de IgG γ facilita la polimerización y aumenta la función efectora tal como la activación del complemento (Smith et al., J Immunol 1995, 154:2226-2236). Los anticuerpos híbridos de IgA/IgG poseen propiedades de ambas IgA e IgG. También se conocen en la técnica métodos para la producción recombinante de anticuerpos de IgM. *Por ejemplo*, Tchoudakova A, et al., High level expression of functional human IgMs in human PER.C6 cells. mAbs. 2009;1(2): 163-171.

A pesar de los avances hechos en el diseño de los anticuerpos, sigue existiendo una necesidad para anticuerpos modificados con propiedades mejoradas, tales como afinidad mejorada, especificidad y/o avidéz, así como la capacidad para unirse a múltiples dianas de unión.

A medida que el campo ha ido progresando, la función del anticuerpo se mejoró a través de medios creativos de modificación de proteínas, tal como para proporcionar mayor afinidad, una semivida más larga y/o mejor distribución de tejido, así como una combinación de tecnologías de moléculas pequeñas y grandes para un aumento del foco de la destrucción celular mediante el suministro de carga tóxica (por ejemplo, conjugados de anticuerpo-fármaco). Otra estrategia para mejorar la función de los anticuerpos se aprovecha de la unión bivalente de la estructura de la inmunoglobulina G (IgG) que permite que una molécula de IgG se una a dos antígenos. De hecho, en determinadas aplicaciones, existe un buen potencial de que anticuerpos asimétricos ejerzan funciones útiles al unir simultáneamente dos antígenos diana diferentes. Para atender esta necesidad, se ha producido una variedad de constructos para proporcionar una sola molécula que se pueda unir a dos antígenos diferentes, lo cual permite funciones que no se han visto antes en la naturaleza. Un ejemplo de este enfoque biespecífico es el «blinatumomab» (MT103 o AMG103), que se une a los receptores CD3 y CD19 de las células T y B, respectivamente. Esta inmovilización de una célula T citotóxica a una célula B cancerosa permite el tratamiento eficaz de la leucemia de células B.

El bloqueo de los puntos de regulación del sistema inmunitario se ha convertido en un área prometedora para el avance del tratamiento del cáncer. Los puntos de regulación del sistema inmunitario se refieren a diversas vías de señalización inhibitoria que se codifican en el sistema inmunitario, y que desempeñan un papel fundamental para mantener la autotolerancia, así como la modulación de la duración y la amplitud de respuestas inmunitarias. Véase, *por ejemplo*, Pardoll, Drew M. "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." Nature Reviews Cancer 12.4 (2012): 252-264; Postow, Michael A. et al., "Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy," J Clin Oncol. 2015 Jun 10;33(17): 1974-82. doi: 10.1200/JCO.2014.59.4358.

A pesar de los resultados positivos de la prueba de concepto en modelos preclínicos, los investigadores han notificado que los anticuerpos monoclonales bloqueantes IgG dirigidos contra componentes de la vía de señalización inhibitoria de las células T (por ejemplo, ipilimumab (Bristol-Myers Squibb) y tremelimumab (MedImmune/AstraZenica), ambos dirigidos contra CTLA4) sólo han logrado resultados mínimos de eficacia en un entorno clínico. *Por ejemplo*, Postow et al., págs.1-2. Además, los tratamientos que involucran anticuerpos monoclonales de IgG han resultado en eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario, tales como eventos dermatológicos, gastrointestinales, hepáticos, endocrinos y otros eventos inflamatorios. *Por ejemplo*, *Id. en la p.4*. Como tal, el uso de anticuerpos IgG monoclonales en el bloqueo de puntos de control inmunitarios puede estar limitado por el índice terapéutico de dichas moléculas, en el sentido

de que la dosis de un anticuerpo IgG monoclonal necesaria para provocar el efecto terapéutico deseado también causa acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario.

- 5 En consecuencia, existe la necesidad de unir moléculas con mayor avidez que proporcionen una mayor potencia de modo que se puedan usar niveles de dosificación más bajos, evitando así la aparición de eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario, mientras se logra un bloqueo efectivo de las vías de señalización inhibitoria de células T.

- 10 La farmacocinética y la farmacodinámica de los anticuerpos monoclonales son complejas y dependen tanto de la estructura del anticuerpo monoclonal, así como del sistema fisiológico al que se dirige. Además, las diferentes clases de anticuerpos típicamente procesarse dentro de un sujeto a través de diferentes sistemas celulares y fisiológicos. Por ejemplo, la secreción en la bilis es una vía importante de eliminación de anticuerpos IgA, mientras que esta ruta no contribuye significativamente a la eliminación de anticuerpos IgG. Más bien, la mayor parte de la eliminación de IgG ocurre a través del catabolismo intracelular, después de la endocitosis en fase
- 15 fluida o mediada por receptor. *Por ejemplo*, Wang et al., Nature 84:5 (2008). Además, se ha demostrado que los anticuerpos IgG de longitud completa se distribuyen principalmente dentro del torrente sanguíneo, mientras que los fragmentos de anticuerpos IgG más pequeños parecen distribuirse dentro del espacio extravascular en mayor medida. *Por ejemplo*, Tabrizi et al., AAPSJ. 2010 Mar; 12(1): 33-43. La barrera hematoencefálica generalmente impide que las moléculas de inmunoglobulina ingresen al sistema nervioso central a través de la
- 20 circulación. *Por ejemplo*, Yu et al., Science Translational Medicine 16:261 (2014). Además, las inmunoglobulinas que se inyectan directamente en un espacio extravascular, tal como el globo ocular, normalmente sólo permanecen en ese espacio unas horas. Véase., *por ejemplo*, Mordenti, J. et al., Toxicological Sciences 52, 101-106 (1999); Mordenti, J. et al., Toxicological Sciences 27(5), 536-544 (1999). Como tal, el control y la manipulación de los factores que influyen en las características de absorción, distribución, metabolismo y/o excreción (ADME) de los anticuerpos monoclonales es una consideración
- 25 importante al diseñar una composición de anticuerpos terapéuticos.

Por consiguiente, existe una necesidad de moléculas de unión cuyas características ADME puedan controlarse y modularse para lograr un efecto terapéutico deseado.

- 30 Sumario de la invención

- 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 una o más moléculas modificadoras de ADME en una secuencia de
- 35 cadena J nativa, y la cadena J modificada puede introducirse en anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA sin comprometer la funcionalidad del anticuerpo receptor o el resto que modula el ADME. Esto permite que el anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA alcance propiedades mejoradas, tal como una mayor concentración y/o una mayor vida media en un sujeto.

- 40 La invención se basa además en el reconocimiento de que, debido a su naturaleza multivalente, los anticuerpos de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA pueden proporcionar una mayor avidez entre el anticuerpo y un antígeno diana, lo que facilita la unión de antígenos con bajo nivel de expresión y/o baja afinidad de unión. Además, la naturaleza opcional multiespecífica de una porción de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de las moléculas de unión en un sujeto permite la unión entre números específicos y/o tipos específicos de dianas de unión, lo que facilita
- 45 la unión entre combinaciones específicas de dianas de antígeno. La porción de cadena J modificada de las moléculas de unión en un sujeto comprende un resto que modula el ADME, que facilita una mayor concentración y/o una mayor vida media en un tejido diana.

- Un aspecto de la invención incluye una molécula de unión que comprende un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA con una cadena J modificada, en donde el anticuerpo IgG/IgM o IgG/IgA contiene una cola IgM o IgA en la cadena pesada IgG, en donde la cadena J modificada comprende un resto que modula el ADME que reduce la eliminación del anticuerpo de la circulación de un sujeto, en donde el resto que modula el ADME está ubicada en el extremo C o el extremo N de la cadena J modificada, y en donde el resto que modula el ADME
- 50 comprende una proteína de albúmina, un fragmento de una proteína de albúmina, un péptido de unión a albúmina, un fragmento de anticuerpo de unión a albúmina, un péptido de unión a FcRn o un fragmento de anticuerpo de unión a FcRn.

En algunas realizaciones, el resto que modula el ADME comprende albúmina sérica humana.

- 60 En algunas realizaciones, el anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a una diana hematológica del cáncer que es CD20.

- Un aspecto de la invención incluye una molécula de unión que comprende un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA con una cadena J modificada, en donde el anticuerpo IgG/IgM o IgG/IgA contiene una cola de IgM o IgA en la cadena pesada de IgG, en donde la cadena J modificada comprende un resto que modula el ADME que aumenta una concentración de la molécula de unión en un tejido del sistema nervioso central de un sujeto,
- 65

5 en donde el resto que modula el ADME está ubicada en el extremo C-terminal o el extremo N-terminal de la cadena J modificada, y en donde el resto que modula el ADME comprende una proteína transferrina, una proteína leptina, un fragmento de anticuerpo de unión al receptor de transferrina, un fragmento de anticuerpo de unión a transferrina, un fragmento de anticuerpo de unión al receptor de insulina, un fragmento de anticuerpo de unión al receptor de IGF-1 o un fragmento de anticuerpo de unión al receptor de leptina.

En algunas realizaciones, el resto que modula el ADME comprende una proteína transferrina o una proteína leptina.

10 Un aspecto de la invención incluye una molécula de unión que comprende un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA con una cadena J modificada, en donde el anticuerpo IgG/IgM o IgG/IgA contiene una cola IgM o IgA en la cadena pesada IgG, en donde la cadena J modificada comprende un resto que modula el ADME que aumenta la retención de la molécula de unión en un espacio extravascular de un sujeto, en donde el resto que modula el ADME está ubicada en el extremo C-terminal o el extremo N-terminal de la cadena J modificada, y
15 en donde el resto que modula el ADME comprende una proteína de unión al ácido hialurónico (HABP), un fragmento de anticuerpo de unión al ácido hialurónico, una proteína TSG-6 o un fragmento de anticuerpo de unión a TSG-6.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a la beta-secretasa 1 (BACE).

25 En algunas realizaciones, la cadena J modificada comprende la secuencia de cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto que modula el ADME se introduce en la secuencia de cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 mediante fusión directa o indirecta, y la fusión indirecta se realiza a través de un enlazador peptídico. En algunas realizaciones, el resto que modula el ADME se introduce en la secuencia nativa de cadena J humana de SEQ ID NO: 1 mediante derivatización química o quimioenzimática. En algunas realizaciones, el resto que modula el ADME se introduce en la cadena J humana nativa mediante un enlazador escindible o no escindible, en donde el enlazador escindible es un enlazador químicamente lábil o un enlazador lábil a enzimas. En algunas realizaciones, el enlazador se selecciona de entre el grupo que consiste en N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), N-succinimidilo-4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres, ésteres activos, aldehídos, compuestos de bis-azido, derivados de bis-diazonio, diisocianatos, y compuestos de flúor bis-activos.

35 Un aspecto de la invención incluye la molécula de unión según cualquiera de los otros aspectos de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer hematológico, un cáncer epitelial o un cáncer del sistema nervioso central. Cualquier referencia a un método de tratamiento practicado en el cuerpo humano o animal debe interpretarse como sustancias y composiciones destinadas a su uso en dichos tratamientos.

40 Breve descripción de los dibujos

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

45 La FIG. 2 muestra las estructuras esquemáticas de la IgA, la IgA dimérica con cadena J y la IgA dimérica integrada con cadena J y la IgA secretora (slgA).

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

50 La FIG. 4A ilustra dos orientaciones diferentes de constructos de cadena J que comprenden una cadena J modificada con un resto que se une a CD3. La ilustración superior es un ejemplo de una cadena J modificada que está en la orientación J-enlazador-V, con un resto de unión (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo scFv anti-CD3) ubicado en el extremo C de la cadena J modificada. La ilustración superior es un ejemplo de una cadena J modificada que está en la orientación J-enlazador-V, con un resto de unión (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo scFv anti-CD3) ubicado en el extremo C de la cadena J modificada.
55 de anticuerpo scFv anti-CD3) ubicado en el extremo C de la cadena J modificada.

La FIG. 4B ilustra dos orientaciones diferentes de constructos de cadena J que comprenden una cadena J modificada con un resto que contiene HSA. La ilustración superior es un ejemplo de una cadena J modificada que está en la orientación J-enlazador-ADME, con un el resto que modula el ADME (por ejemplo, un polipéptido de albúmina sérica humana (HSA)) ubicada en el extremo C de la cadena J modificada. La ilustración superior es un ejemplo de una cadena J modificada que está en la orientación J-enlazador-ADME, con un resto que modula el ADME (por ejemplo, un polipéptido de albúmina sérica humana (HSA)) ubicada en el extremo N-terminal de la cadena J modificada.

65 La FIG. 5 es una ilustración esquemática de un pentámero IgM asimétrico con especificidad de unión para un antígeno diana, que comprende un resto que modula el ADME fusionada a la cadena J en un extremo, y un

resto de unión a CD3 en el extremo opuesto de la cadena J.

La FIG. 6 muestra el análisis SDS PAGE de anticuerpos IgM anti-CD20 con o sin varios restos de unión anti-CD3 en la cadena J en cualquier orientación. Los pentámeros de IgM que contienen cadena J se distinguen fácilmente de los IgM hexaméricos sin cadena J.

La FIG. 7 es un gráfico que muestra la viabilidad celular en función de la concentración de anticuerpos para varios constructos de anticuerpos en un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento en presencia de IgG, IgM o IgM que llevan varias cadenas J. Se proporciona una tabla con los valores CE50 para cada constructo.

La FIG. 8 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de activación de células T que compara la capacidad de un IgM anti-CD20 con un resto de unión a CD3 en la cadena J para activar células T, en comparación con anticuerpos IgM anti-CD20 sin un resto de unión a CD3 en la cadena J, así como anticuerpos IgG anti-CD20.

La FIG. 9, el panel A es un gráfico que muestra la concentración de IgM en ratones en ausencia de prolongación de la vida media para la unión a CDIM de IgM 55.5. El panel B es una tabla que proporciona parámetros farmacocinéticos.

La FIG. 10 es un gráfico que muestra los resultados de un ELISA específico de multímeros para anticuerpos IgM anti-CD20 que demuestra la unión mucho más estrecha de IgM.

La FIG. 11, el panel A muestra una ilustración de un modelo de biodistribución temporal. El panel B muestra datos de la biodistribución de IGM-55.5 in vivo utilizando el colorante infrarrojo lejano conjugado Vivo Tag 680 (Perkin Elmer).

La FIG. 12 El panel A es una ilustración esquemática que representa el etiquetado específico del sitio de glicanos en IgG utilizando un enfoque quimioenzimático. El panel B muestra la posición de los glicanos en la cadena pesada y la cadena J de IgM. El panel C muestra los geles no reducidos y reducidos para los productos etiquetados después de utilizar el etiquetado equimioenzimático.

La FIG. 13 enumera las dianas de anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA y los restos que modulan ADME que se pueden colocar en la cadena J. Cualquiera de las dianas de anticuerpos enumeradas en la columna de la izquierda puede combinarse con cualquiera de los restos que modulan ADME en una cadena J enumeradas en la columna de la derecha.

La FIG. 14 es una ilustración de la estructura del antígeno Tn.

La FIG. 15 es una ilustración de la estructura del ácido hialurónico.

La FIG. 16, el panel A, es un gráfico que muestra la concentración de anticuerpos en función del tiempo en un experimento farmacocinético en ratones BALB/c para una IgG modelo (Rituximab), una IgM policlonal derivada de suero humano y una IgM derivada de células CHO diseñada (55.5). El panel B es una tabla que muestra la vida media alfa y beta y el AUC de estos tres anticuerpos diferentes.

La FIG. 17, el panel A, es un gráfico que muestra la concentración de anticuerpos en función del tiempo en un experimento PK en ratones BALB/c que prueba el efecto de la incorporación de la cadena J en IgM. El panel B es una tabla que muestra la vida media alfa y beta y el AUC de tres anticuerpos IgM diferentes con tipo salvaje (wt) o cadena J fusionada con un scFv configurado para unirse a las células T.

La FIG. 18 es un gráfico que muestra la concentración sérica en función del tiempo para tres anticuerpos modelo diferentes: Rituximab (IgG); un IgM anti-CD20 con un dominio configurado para unirse a células T fusionado al extremo N de la cadena J; y un IgM anti-CD20 con un dominio de unión a albúmina (ABD) fusionado al extremo N-terminal de la cadena J con un enlazador de 15 aminoácidos (A15J).

La FIG. 19 es una imagen de un gel PAGE reductor y un análisis de transferencia Western de los anticuerpos enumerados en la tabla. La incorporación de la cadena J con o sin albúmina sérica humana fusionada en cualquier orientación con respecto a la cadena J se visualiza utilizando transferencia Western con un anticuerpo anti-cadena J.

La FIG. 20 es un gráfico que muestra la actividad de CDC en función de la concentración para cuatro anticuerpos IgM, demostrando que la incorporación de un resto tan grande como 65 KDa HSA no altera la actividad de CDC de IgM.

La FIG. 21, el panel A, es un gráfico que muestra la concentración en función del tiempo en un experimento de

farmacocinética en ratones, para un anticuerpo IgM que tiene una configuración HSA-15-J en la cadena J. El panel B es un gráfico que muestra la concentración en función del tiempo para un experimento farmacocinético en ratón con un anticuerpo IgM que tiene una configuración J-15-HSA en la cadena J.

5 La FIG. 22 es una tabla que muestra la vida media alfa y beta en horas y el AUC para 6 anticuerpos diferentes.

La FIG. 23 es una imagen de un gel PAGE reductor y un análisis de transferencia Western de los anticuerpos enumerados en la tabla, uno de los cuales (1.5.3V15J15ABD) tiene una configuración de cadena J bidentada.

10 La FIG. 24 es un gráfico que muestra la actividad de CDC en función de la concentración para anticuerpos que tienen la configuración de cadena J indicada. El ABD-IgM bidentado tiene esencialmente la misma actividad que el IgM con o sin cadena J.

15 La FIG. 25 es un gráfico que muestra la actividad de CDC en función de la concentración para anticuerpos que tienen la configuración de cadena J indicada. La HSA-IgM bidentada tiene esencialmente la misma actividad que la IgM con o sin cadena J.

20 La FIG. 26, el panel A, es un gráfico que muestra la concentración en función del tiempo para un anticuerpo IgM que tiene una configuración de cadena J bidentada VJ-ABD. El panel B es un gráfico que muestra la concentración en función del tiempo para un anticuerpo IgM que tiene una configuración de cadena J bidentada V-J-HSA.

La FIG. 27 es una tabla que muestra la vida media alfa y beta en horas y los parámetros AUC para 4 anticuerpos diferentes con diversas configuraciones de sus cadenas J.

25 La FIG. 28, el panel A y el panel B son gráficos que muestran el porcentaje de células B CD19+ previas a la dosis en función de la dosis (ng/ratón) para varios constructos (por ejemplo, 1.5.3V15J15HSAwt y 1.5.3V15J15HSA (K573P)).

30 Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

35 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior y el inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, queda comprendido dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos menores pueden estar incluidos de forma independiente en los intervalos menores comprendidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado.

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

El término "ADME" como se utiliza en este documento es una abreviatura de absorción, distribución, metabolismo y excreción, y se utiliza en el sentido más amplio para describir la disposición de un compuesto farmacéutico dentro de un organismo.

50 El término "el resto que modula el ADME" se utiliza en este documento en el sentido más amplio para abarcar cualquier entidad química capaz de modular una o más de las características de absorción, distribución, metabolismo y excreción de una molécula a la que está unida. Los ejemplos de restos que modulan ADME incluyen, sin limitación, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos, conjugados anticuerpo-fármaco, moléculas similares a anticuerpos, fragmentos de moléculas similares a anticuerpos que se unen a antígenos, ligandos, receptores, proteínas y polipéptidos (que incluyen péptidos). Los restos de unión preferidos son fragmentos de anticuerpos que se unen al antígeno, preferiblemente con una función biológica. Un ejemplo de una función biológica es la capacidad de un el resto que modula el ADME de unirse a una diana que extiende la vida media de una molécula de unión en un sujeto.

60 El término "anticuerpo" incluye los anticuerpos monoclonales (que incluyen los anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), las moléculas de cadena simple, así como los fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv). El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa de manera intercambiable con "anticuerpo" en este documento. La unidad básica de anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. A menos que se especifique lo contrario, el término "anticuerpo" se utiliza en esta invención en el

sentido más amplio y específicamente incluye todos los isotipos, subclases y formas de anticuerpos, que incluyen los anticuerpos de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y sus fragmentos, preferiblemente fragmentos de unión al antígeno. Los anticuerpos preferidos en esta invención incluyen anticuerpos de IgM e IgA y sus fragmentos de unión al antígeno, que se pueden modificar para incluir secuencias de otros isotipos, tal como IgG para producir anticuerpos quiméricos.

En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas generalmente tiene alrededor de 150.000 daltons. Cada cadena L está ligada a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están ligadas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L tiene también puentes disulfuro intracatenarios espaciados en intervalos regulares. Cada cadena H tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_H) seguido por tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N-terminal, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que los residuos particulares de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y V_L entre sí forma un único sitio de unión al antígeno.

La IgM es una glicoproteína que forma polímeros donde múltiples inmunoglobulinas están enlazadas de forma covalente entre sí con enlaces disulfuro. La IgM existe principalmente como un pentámero pero también como un hexámero y por lo tanto contiene 10 o 12 sitios de unión a antígeno. La forma pentamérica normalmente contiene un polipéptido adicional, llamado la cadena J, pero también puede estar hecho 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 gran avidez y es particularmente efectiva en la activación del complemento. A diferencia de la IgG, la cadena pesada en los monómeros de IgM está compuesta de un dominio variable y cuatro constantes. Los dominios constantes de IgM están designados en esta invención como CM1 o $C_{\mu 1}$, CM2 o $C_{\mu 2}$, CM3 o $C_{\mu 3}$ y CM4 o $C_{\mu 4}$, donde las denominaciones "CM" y " C_{μ} " se utilizan de manera intercambiable. La estructura de un pentámero de IgM se ilustra en la FIG. 1.

El término "IgM" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio e incluye específicamente moléculas IgM mono-específicas y multiespecíficas (incluidas las biespecíficas), como, por ejemplo, las moléculas de unión a IgM multiespecíficas descritas en la publicación PCT No. WO2015053887A1.

El término "unidad de unión a IgM" o "unidad de unión al anticuerpo de 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 secuencia de dominio variable (V_H) que se une a una diana (por ejemplo, antígeno), con o sin una secuencia asociada de dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L).

El término "unidad de unión a IgM biespecífica" o "unidad de unión al anticuerpo de IgM biespecífica" e utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente un par de polipéptidos de región constante de cadena pesada de anticuerpos IgM, que comprenden al menos un dominio constante CM4, fusionado a una secuencia de dominio variable (V_H), cada secuencia de dominio variable uniéndose a una diana diferente, con o sin secuencias asociadas de dominio variable de cadena ligera de anticuerpos (V_L). En una realización, el anticuerpo de IgM biespecífica comprende dos regiones de unión al antígeno de $V_H V_L$, cada una capaz de unirse a un epítipo diferente en un antígeno o a epítopos en dos antígenos diferentes. Las unidades de unión al anticuerpo de IgM biespecífica pueden ser de longitud completa de una sola especie, o estar quimerizadas o humanizadas. Los anticuerpos de IgM biespecífica de la presente invención tienen una estructura de anillo hexamérica o pentamérica que comprende cinco o seis unidades de unión a IgM biespecífica.

El término "IgM multiespecífica" se utiliza en esta invención en el sentido más amplio para referirse a anticuerpos de IgM con dos o más especificidades de unión. Por tanto, el término "multiespecífico" incluye "biespecífico", por ejemplo anticuerpos biespecíficos o unidades de unión biespecíficas, que incluyen pentámeros de IgM que comprenden al menos dos subunidades mono-específicas, donde cada una se une a un antígeno diferente (AA, BB), o cinco o seis subunidades biespecíficas, donde cada una se une a dos antígenos diferentes (AB, AB). Por lo tanto, los pentámeros de IgM biespecífica y multiespecífica pueden incluir cinco unidades de unión biespecíficas idénticas, unidades de unión de IgM mono-específicas, al menos dos de ellas tienen especificidades de unión diferentes, o cualquier combinación de las mismas.

Una "cadena pesada de anticuerpo IgM de longitud completa" es un polipéptido formado en dirección N-terminal a C-terminal por un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H), un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 1 (CM1 o $C_{\mu 1}$), un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 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 tales como se definen en esta invención comprenden cinco o seis monómeros (unidades de unión), cada uno con dos sitios de unión a antígeno, que específicamente se unen a dos dianas de unión diferentes (epítopos). El extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa denota el último

aminoácido en el extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera. El extremo N-terminal de la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa denota el primer aminoácido en el extremo N-terminal de la cadena pesada o ligera.

- 5 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, existen dos isotipos de IgA, IgA1 e IgA2. IgA, de manera similar a IgG, contiene tres dominios constantes (CA1-CA3 o C α 1-C α 3), con una región bisagra entre los dominios C α 1 y C α 2, en donde las designaciones "CA" y "C α " se usan de manera intercambiable. Todos los isotipos IgA tienen una "pieza de cola" de 18 aminoácidos, que está ubicada en el extremo C-terminal respecto al dominio C α 3, que permite la formación de Ig polimérica (véase, por ejemplo, García-Pardo et al., 1981, J. Biol. Chem. 256, 11734-11738 y Davis et al., 1988, Eur. J. Immunol. 18, 1001-1008). La IgA de suero es un monómero pero también se puede polimerizar. En su forma de secreción, la IgA comprende de 2-5 de las unidades de 4 cadenas básicas, ligadas mediante una cadena J, que puede incluir una pieza final, y puede estar asociada mediante un componente de secreción. En la FIG. 2 se ilustran las estructuras de la pieza de cola, la IgA dimerica y la IgA secretora, asociada a un componente secretor (slgA). Los anticuerpos IgA pueden dividirse a su vez en las subclases IgA1 e IgA2. El término anticuerpo "IgA" se usa en esta invención para incluir específicamente todas las subclases, es decir, anticuerpos IgA1 e IgA2, que incluyen formas dimericas y multiméricas, con y sin un componente de secreción, así como los fragmentos, preferiblemente fragmentos de unión a antígeno, de dichos anticuerpos. Para los fines de la presente invención, el anticuerpo de IgA preferiblemente es un dímero, donde las dos piezas de cola están conectadas mediante una cadena J (véase, la FIG. 2).

El término "IgA" se utiliza en esta invención en el sentido más amplio y específicamente incluye moléculas IgA monoespecífica y multiespecífica, tal como, por ejemplo, las moléculas de unión a IgA multiespecífica descritas en la publicación PCT No. WO2015120474A1.

- 25 El término "IgA multiespecífica" se usa en este 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", por ejemplo, anticuerpos biespecíficos o unidades de unión biespecífica, que incluyen dímeros de IgA que comprenden dos subunidades monoespecíficas, cada una se une a un antígeno diferente (AA, BB), o dos subunidades biespecíficas, cada una se une a dos antígenos diferentes (AB, AB).

- 35 En una realización, las moléculas IgA multiespecífica dimericas consisten en dos unidades de unión monoespecífica, donde cada unidad de unión tiene especificidad de unión respecto a una diana de unión diferente (AA, BB). En otra realización, en las moléculas IgA dimerica al menos una de las dos unidades de unión tiene dos especificidades de unión diferentes (es decir, es una biespecífica, por ejemplo, AA, A,B o AA, BC). En otra realización, cada una de las dos unidades de unión tiene dos especificidades, que pueden ser iguales (AB, AB) o diferentes (AC, CD o AB, AC, por ejemplo).

- 40 El término "unidad de unión al anticuerpo IgA biespecífica" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente un par de polipéptidos de región constante de cadena pesada de anticuerpos IgA, que comprenden al menos un dominio constante CA3, fusionado a una secuencia de dominio variable (V_H), cada secuencia de dominio variable uniéndose a una diana diferente, con o sin secuencias asociadas de dominio variable de cadena ligera de anticuerpos (V_L). En una realización, el anticuerpo de IgA biespecífica comprende dos regiones de unión al antígeno de V_HV_L , cada una capaz de unirse a un epítipo diferente en un antígeno o a epítopos en dos antígenos diferentes. Las unidades de unión al anticuerpo de IgA biespecífica pueden ser de longitud completa de una sola especie, o estar quimerizadas o humanizadas.

- 50 Una "cadena pesada de anticuerpo IgA de longitud completa" es un polipéptido formado en dirección N-terminal a C-terminal por un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H), un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 1 (CA1 o C α 1), un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 2 (CA2 o C α 2), y un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 3 (CA3 o C α 3). Los anticuerpos de IgA de longitud completa bi- o multi-específicos según la invención comprenden dos monómeros (unidades de unión), cada uno de los cuales puede ser monoespecífico o biespecífico, con o sin un componente de secreción. Por lo tanto, los anticuerpos de IgA multiespecíficos de la presente invención pueden incluir unidades de unión monoespecífica y biespecífica, siempre y cuando el anticuerpo de IgA resultante tenga al menos dos especificidades de unión. El extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa denota el último aminoácido en el extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera. El extremo N-terminal de la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa denota el primer aminoácido en el extremo N-terminal de la cadena pesada o ligera.

- 60 Para más detalles de la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª Edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, página 71 y capítulo 6.

- 65 El término "interfaz", tal como se usa en este documento, se utiliza para referirse a una región, que comprende aquellos residuos de aminoácidos de "contacto" (u otros grupos que no son aminoácidos, tal como, por ejemplo,

grupos 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.

- 5 El término "interfaz asimétrica" se usa para referirse a una interfaz (tal como se define anteriormente en esta invención) formada entre dos cadenas de anticuerpo, tal como una primera y una segunda región constante de cadena pesada de IgM y/o entre una región constante de cadena pesada de IgM y su cadena ligera coincidente, en donde los residuos de contacto en la primera y la segunda cadena son diferentes por diseño, que comprende residuos de contacto complementarios. La interfaz asimétrica se puede crear mediante interacciones de botones/ojales y/o acoplamiento de puentes de sal (intercambios de carga) y/u otras técnicas conocidas en la técnica, tal como por ejemplo, mediante estrategia de CrossMab para el acoplamiento de una cadena pesada a su cadena ligera correspondiente.
- 10 Una "cavidad" u "ojal" se refiere al menos a una cadena lateral de aminoácidos que está encastrada a partir de la interfaz del segundo polipéptido y, por lo tanto, aloja una protuberancia ("botón" correspondiente en la interfaz adyacente del primer polipéptido. La cavidad (ojal) 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 menos un residuo de aminoácido "original" en la interfaz del segundo polipéptido es reemplazado por ADN que codifica al menos un residuo de aminoácido "de importación" que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo de aminoácido original. Se apreciará que puede haber más de un residuo de importación original y correspondiente. El límite superior para el número de residuos originales que son reemplazados es el número total de residuos en la interfaz del segundo polipéptido. Los residuos de importación preferidos para la formación de una cavidad son usualmente residuos de aminoácidos de origen natural y se seleccionan preferiblemente de entre alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V) y glicina (G). Los residuos de aminoácidos más preferidos son serina, alanina o treonina, lo más preferiblemente alanina. En la realización preferida, el residuo original para la formación de la protuberancia tiene un volumen de cadena lateral grande, tal como tirosina (Y), arginina (R), fenilalanina (F) o triptófano (W).
- 15 Un residuo de aminoácido "original" es uno que se reemplaza con un residuo de "importación" que puede tener un volumen de cadena lateral más pequeño o más grande que el residuo original. El residuo de aminoácido de importación puede ser un residuo de aminoácido de origen natural o de origen no natural, pero preferiblemente es el primero.
- 20 Por "residuo de aminoácido de origen no natural" significa un residuo que no está codificado por el código genético, pero que es capaz de unirse de manera covalente a uno o más residuos de aminoácidos adyacentes en la cadena de polipéptidos. Ejemplos de residuos de aminoácidos de origen no natural son la norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuos de aminoácidos tal como aquellos descritos en Ellman et al., Meth. Enzym. 202:301-336 (1991), por ejemplo. Para generar dichos residuos de aminoácidos de origen no natural, se pueden utilizar los procedimientos de Noren et al. Science 244: 182 (1989) y Ellman et al., supra. En resumen, esto implica la activación química de un ARNt supresor con un residuo de aminoácido de origen no natural, seguido de transcripción y traducción del ARN in vitro. Los métodos de la invención actual, en determinadas 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 del total de residuos en la interfaz del primero o segundo polipéptido comprenderá residuos de aminoácidos originales que se reemplazan. Los residuos originales preferidos para el reemplazo están "enterrados". Por "enterrado" se entiende que el residuo se encuentra esencialmente inaccesible al solvente. El residuo de importación preferido no es cisteína para evitar la posible oxidación o desemparejamiento de los enlaces disulfuro.
- 25 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 se puede ubicar en la cavidad sin perturbar de forma significativa la asociación normal del primer y el segundo polipéptidos en la interfaz. Dado que las protuberancias tales como Tyr, Phe y Trp no se extienden típicamente de forma perpendicular desde el eje de la interfaz y tienen conformaciones preferidas, la alineación de una protuberancia con una cavidad correspondiente depende del modelado del par protuberancia/cavidad basándose en una estructura tridimensional tal como aquella obtenida mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Esto se puede lograr usando técnicas ampliamente aceptadas en la técnica, que incluyen técnicas de modelización molecular.
- 30 Por "ácido nucleico original" se entiende el ácido nucleico que codifica a un polipéptido de interés que se puede "alterar" (es decir, que se puede mutar o modificar genéticamente) para codificar una protuberancia o cavidad. El ácido nucleico original o de partida puede ser un ácido nucleico de origen natural o puede comprender un ácido nucleico que ha sido sometido a alteración anterior (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo humanizado). Por "alterar" el ácido nucleico se entiende que el ácido nucleico original muta al insertar, delecionar o reemplazar al menos un codón que codifica un residuo de aminoácido de interés. Normalmente,
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

un codón que codifica un residuo original es reemplazado por un codón que codifica un residuo de importación. Las técnicas para modificar genéticamente un ADN de esta manera se han revisado en *Mutagenesis: a Practical Approach*, M. J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, UK, (1991), e incluyen mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis en casete y mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo.

5

La protuberancia o cavidad se puede "introducir" en la interfaz del primer o segundo polipéptido mediante medios sintéticos, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes, síntesis de péptidos in vitro, aquellas técnicas para introducir residuos de aminoácidos de origen no natural previamente descritos, mediante acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas. Por consiguiente, la protuberancia o cavidad que se "introduce" es "de origen no natural" o "no nativa", lo que significa que no existe en la naturaleza o en el polipéptido original (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado).

10

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 favorable energéticamente de una cadena lateral de aminoácido. La cantidad de rotámeros para los varios residuos de aminoácidos son revisados en Ponders and Richards, J. Mol. Biol. 193: 775-791 (1987).

15

A menos que se establezca de otro modo, el término "anticuerpo" incluye específicamente anticuerpos de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD e IgM humanos y no humanos nativos, que incluyen las variantes de origen natural. Por lo tanto, por ejemplo, la secuencia de IgM humana se encuentra disponible con el número de acceso a GenBank X14940.1, mientras las variantes se han notificado como GenBank CAB37838.1, CAC20458.1, AFM37312.1, X57331.1 y J00260.1.

20

El término "nativo" con referencia a un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o una cadena J) se utiliza en esta invención para referirse a un polipéptido que tiene una secuencia que ocurre en la naturaleza, sin importar su modo de preparación. Por lo tanto, los términos "nativo" y "secuencia nativa" se usan en esta invención de manera intercambiable, y abarcan de forma expresa polipéptidos recombinantes con una secuencia que se encuentra en la naturaleza.

25

El término "cadena J de secuencia nativa" o "cadena J nativa", tal como se usa en este documento, se refiere a la cadena J de los anticuerpos de IgM o IgA de secuencia nativa de cualquier especie de animal, que incluye la cadena J humana madura, la secuencia de aminoácidos que se muestra en la FIG. 3 (SEQ ID NO: 1).

30

El término "cadena J modificada" se utiliza en este documento para referirse a variantes de polipéptidos de cadena J de secuencia nativa que comprenden un resto que modifica ADME extraño introducida en la secuencia nativa. La introducción puede lograrse por cualquier medio, incluida la fusión directa o indirecta de un resto que modifica ADME extraño o mediante la 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 SEQ ID NO: 1 modificada por la introducción de un resto que modifica ADME. El término engloba específicamente, sin limitación, una cadena J humana de secuencia nativa de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 modificada por la introducción de un resto que modula ADME extraña que no interfiere con la polimerización eficiente (dimerización) de IgM o IgA y la unión de dichos polímeros (dímeros) a una diana.

35

40

El término "polipéptido" se utiliza en esta invención en el sentido más amplio e incluye secuencias de péptidos. El término "péptido" generalmente describe las cadenas moleculares lineales de aminoácidos que contienen hasta aproximadamente 60, preferiblemente hasta aproximadamente 30 aminoácidos ligados de forma covalente por enlaces peptídicos.

45

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un único sitio antigénico. Es más, en contraste con las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter de que el anticuerpo se obtuvo a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo a través de cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención se pueden elaborar mediante el procedimiento de hibridoma, descrito por primera vez por Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, o se pueden elaborar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en 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.

50

55

60

65

Los anticuerpos monoclonales descritos en este documento incluyen específicamente anticuerpos "químéricos"

(inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4,816,567; y Morrison et al. (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 mayoría, 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) tal como un ratón, una rata, un conejo o un primate no humano, que tiene la especificidad, la afinidad y/o la capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de región de estructura (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana también son reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Es más, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden realizarse para refinar adicionalmente el desempeño de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá básicamente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o básicamente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o básicamente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, 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 esta invención es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural en una célula hospedadora recombinante. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos, así como subproductos no deseados de la producción. En una realización preferida de la invención, un anticuerpo aislado en esta invención se purificará (1) a más de un 95 % en peso, o mayor que 98 % en peso o mayor que 99 % en peso, determinado por métodos de SDS-PAGE o SEC-HPLC (2) a un punto suficiente como para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos interna o de extremo N-terminal mediante el uso de un secuenciador de aminoácidos, o (3) a homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras, utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción argéntica. Habitualmente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

El término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específica para" se refiere a la unión de dos miembros de un par de unión, como la unión de un anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo, un epítipo en un polipéptido, péptido u otra diana particular (por ejemplo, una glicoproteína diana), y significa una unión que es mensurablemente diferente de una interacción inespecífica (por ejemplo, una interacción inespecífica puede ser la unión a albúmina sérica bovina o caseína). La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de un resto de semivida, o de un anticuerpo, o de un anticuerpo modificado mediante la introducción de un resto de semivida, a una molécula diana en comparación con la unión a una molécula de control. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse mediante competencia con una molécula de control similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana sin etiquetar. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana etiquetada de una sonda se inhibe de forma competitiva mediante el exceso de diana sin etiquetar. El término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específica para" un epítipo o un polipéptido particular en una diana de polipéptido particular tal como se usa en esta invención se puede exhibir, por ejemplo, mediante una molécula con una Kd para la diana de al menos alrededor de 200 nM, alternativamente al menos alrededor de 150 nM, alternativamente al menos alrededor de 100 nM, alternativamente al menos alrededor de 60 nM, alternativamente al menos alrededor de 50 nM, alternativamente al menos alrededor de 40 nM, alternativamente al menos alrededor de 30 nM, alternativamente al menos alrededor de 20 nM, alternativamente al menos alrededor de 10 nM, alternativamente al menos alrededor de 8 nM, alternativamente al menos alrededor de 6 nM, alternativamente al menos alrededor de 4 nM, alternativamente al menos alrededor de 2 nM, alternativamente al menos alrededor de 1 nM, o mayor. En ciertos casos, el término "unión específica" se refiere a la unión donde una molécula se une a un epítipo o polipéptido particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo del polipéptido.

"Afinidad de unión" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en esta invención, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X respecto a su compañero Y puede representarse generalmente 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 puede calcularse usando métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en

esta invención. 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 rápidamente y tienden a permanecer unidos por más tiempo. Se conoce en la técnica una variedad de procedimientos para medir la afinidad de unión.

5 Tal como se usa en esta invención, la "Kd" o "valor de Kd" se refiere a una constante de disociación medida mediante una técnica apropiada para el anticuerpo y par diana, por ejemplo utilizando ensayos de resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizados a alrededor de 10 unidades de respuesta (UR).

10 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, fusión genética o química directa, acoplamiento a través de un enlazador o un agente de reticulación y asociación no covalente.

15 El término "fusión" se usa en esta invención para referirse a la combinación de secuencias de aminoácidos de diferente origen en una cadena polipeptídica mediante combinación en marco de sus secuencias de codificación de nucleótidos. El término "fusión" abarca de forma explícita fusiones internas, es decir, inserción de secuencias de diferente origen dentro de una cadena polipeptídica, además de la fusión a uno de sus extremos terminales. El término "fusión" se usa en esta invención para referirse a la combinación de secuencias de aminoácidos de diferente origen.

20 El término "valente", tal como se usa en esta invención, denota la presencia de una cantidad especificada de sitios de unión en un anticuerpo. Como tales, los términos "bivalente", "tetraivalente" y "hexavalente" designan la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente. Por tanto, si en un anticuerpo IgA biespecífico según la presente invención cada unidad de unión es bivalente, el anticuerpo IgA biespecífico tendrá 4 valencias.

25 El término "epítipo" incluye cualquier determinante molecular capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas 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 epítipo es una región de un antígeno que está unida mediante un anticuerpo. Una "región de unión" es una región en una diana de unión unida mediante una molécula de unión.

30 La "especificidad poliepitópica" hace referencia a la capacidad de unión de forma específica a dos o más epítipos diferentes en una o más dianas iguales o diferentes. "Monoespecífico" se refiere a la capacidad de unión de un solo epítipo. Según una realización, el anticuerpo de IgM biespecífico se une a cada epítipo con una afinidad de al menos 10^{-7} M, o 10^{-8} M o mejor.

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

40 El término "antígeno" se refiere a una entidad o fragmento del mismo que puede unirse a un anticuerpo o desencadenar una respuesta inmunitaria celular. Un inmunógeno se refiere a un antígeno, que puede provocar una respuesta inmunitaria en un organismo, particularmente un animal, más particularmente un mamífero que incluye un humano. El término antígeno incluye regiones conocidas como determinantes antigénicos o epítipos, tal como se define anteriormente.

45 Tal como se usa en esta invención, el término "inmunogénico" se refiere a sustancias, que provocan la producción de anticuerpos y/o activan células T y/u otras células inmunitarias reactivas dirigidas contra un antígeno del inmunógeno.

50 Un "sitio de unión al antígeno" o "región de unión al antígeno" de un anticuerpo de la presente invención típicamente contiene seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuyen en varios grados con la afinidad del sitio de unión para el antígeno. Existen 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). El alcance de la CDR y regiones de estructura (FR) está determinado por la comparación con una base de datos compilada de secuencias de aminoácidos en las que aquellas regiones han sido definidas según una variabilidad entre las secuencias y/o información estructural de los complejos de anticuerpo/antígeno. También incluidos dentro del alcance de la invención se encuentran los sitios de unión al antígeno funcionales que comprenden menos CDR (es decir, donde la especificidad de unión está determinada por tres, cuatro o cinco CDR). Menos que un conjunto completo de 6 CDR puede ser suficiente para unirse a algunas dianas de unión. Por tanto, en algunos casos, las CDR de un dominio VH o VL solo serán suficientes. Es más, puede que determinados anticuerpos no tengan sitios de unión no asociados a CDR para un antígeno. Tales sitios de

unión están específicamente incluidos dentro de la presente definición.

El término "célula hospedadora", tal como se utiliza en la solicitud actual, denota cualquier tipo de sistema celular que puede diseñarse para generar los anticuerpos según la invención actual. En una realización, se usan células de ovario de hámster chino (CHO) como células hospedadoras.

Tal como se usa en esta invención, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable y todas dichas designaciones incluyen la progenie. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula primaria en un sujeto y los cultivos derivados de esta sin importar el número de transferencias. Se entiende también que no toda la progenie puede ser precisamente idéntica en cuanto al contenido de ADN, debido a mutaciones inadvertidas o deliberadas. Se incluye la progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada en la célula originalmente transformada.

Un ácido nucleico está "unido de forma operativa" cuando está en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o secuencia líder de secreción se encuentra unido de forma operativa al ADN de un polipéptido si se expresa como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido de forma operativa a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia, o un sitio de unión a ribosoma se une de forma operativa a una secuencia codificante si se ubica de manera que facilite la traducción. Generalmente, "unido de forma operativa" significa que las secuencias de ADN que se ligan son contiguas, y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. El enlace se logra mediante unión en sitios de restricción convenientes. En caso de que no existan tales sitios, se usan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

El término "extraño" con referencia a un "resto que modula ADME" se utiliza en este documento para referirse a un resto que modula ADME que no está presente en una secuencia polipeptídica nativa de referencia en el mismo lugar. Por tanto, una secuencia de polipéptido extraño (que incluye secuencias de péptidos), puede estar comprendida dentro de la secuencia nativa correspondiente pero en una localización diferente. En una realización preferida de la invención, la secuencia "extraña" no se encuentra presente en la secuencia nativa correspondiente en ninguna ubicación. El término "antagonista", como se usa en este documento, se refiere a una molécula que causa una disminución en una función o actividad en comparación con la misma función o actividad en ausencia de la molécula. Un "antagonista" de una vía de señalización es, por lo tanto, una molécula cuya presencia provoca una disminución en una función o actividad de la vía de señalización. El término "antagonizar", como se usa en este documento, se refiere a provocar una disminución en una función o actividad.

El término "agonista", como se usa en este documento, se refiere a una molécula que provoca un aumento en una función o actividad en comparación con la misma función o actividad en ausencia de la molécula. Un "agonista" de una vía de señalización es, por lo tanto, una molécula cuya presencia provoca un aumento en una función o actividad de la vía de señalización. El término "agonizar", como se usa en este documento, se refiere a provocar un aumento en una función o actividad.

El término "vía de señalización inhibidora de células T", como se usa en este documento, se refiere a una vía de señalización de células T que conduce a una disminución, bloqueo o detención cualitativa o cuantitativa de una respuesta inmunitaria de células T.

El término "vía de señalización estimuladora de células T", como se usa en este documento, se refiere a una vía de señalización de células T que conduce a un aumento cualitativo o cuantitativo o al mantenimiento de una respuesta inmunitaria de células T.

El término "diana de expresión de bajo nivel", como se usa en este documento, se refiere a una diana cuyo nivel de expresión en una célula diana varía de 0 a 1+, según se determina mediante análisis de tejido por inmunohistoquímica (IHC), preferiblemente realizado en secciones de tejido congeladas, fijadas con formalina y embebidas en parafina. El Colegio Americano de Patólogos (CAP), por ejemplo, ofrece pautas para determinar el nivel de expresión mediante IHC, y se ejemplifican en las Recomendaciones de la Guía de Pruebas HER2 de ASCO-CAP, disponibles en http://www.cap.org/apps/docs/committees/immunohistochemistry/summary_of_recommendations.pdf.

El término "diana de baja afinidad", como se usa en este documento, se refiere a una diana cuya interacción de unión con un anticuerpo tiene una constante de disociación K_d que es mayor que o igual a un valor que va de aproximadamente 10 a 100 nM, tal como de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 nM, medido mediante ELISA.

El término "vida media" se utiliza en este documento en el sentido más amplio para referirse al período de tiempo requerido para que la concentración o cantidad de una molécula de unión se reduzca a la mitad en el cuerpo de un sujeto.

El término "polipéptido de unión a albúmina" como se utiliza en este documento se refiere a un polipéptido que se une específicamente a una proteína de albúmina.

- 5 El término "dominio Fc" como se utiliza en este documento se refiere ampliamente a una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo dominios Fc de secuencia nativa y dominios Fc variantes.

Los términos "extravascular" y "espacio extravascular" como se utilizan en este documento se refieren ampliamente a una parte de un sujeto que está situada fuera de los vasos sanguíneos del sujeto (por ejemplo, arterias y venas).

El término "espacio intraarticular" como se utiliza en este documento se refiere a cualquier porción de un sujeto que esté situada dentro de una articulación que se encuentra, por ejemplo, entre dos huesos (por ejemplo, el interior de una articulación de la rodilla).

El término "espacio intravítreo" como se utiliza en este documento se refiere a cualquier porción de un sujeto que esté situada dentro de un globo ocular.

Descripción detallada

Diseño y producción de moléculas de unión con cadena J modificada

La IgM es la primera inmunoglobulina producida por células B en respuesta a la estimulación por el antígeno, y se encuentra presente a alrededor de 1,5 mg/ml en suero con una semivida de 5 días. La IgM es una molécula pentamérica o hexamérica. Tal como IgG, los monómeros de IgM consisten en dos cadenas ligeras y dos pesadas. Sin embargo, mientras que la IgG contiene tres dominios constantes de cadena pesada (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}), la cadena pesada (μ) de IgM de manera adicional contiene un cuarto dominio constante (C_{H4}), de forma similar a las cadenas pesadas ϵ en IgE. Este dominio constante extra está ubicado 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 al antígeno relativos al dominio Fc de los anticuerpos de IgG e IgA.

Cinco monómeros de IgM forman un complejo con una cadena de polipéptidos pequeña 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 sea secretada de células de producción de anticuerpos. Mientras que la cristalización de IgM ha probado ser notoriamente desafiante, Czajkowsky y Shao (PNAS 106(35): 14960-14965, 2009) recientemente publicaron un modelo estructural basado en homología de IgM, basado en la estructura del dominio Fc de IgE y los emparejamientos de disulfuro conocidos. Los autores notifican que el pentámero de IgM humana es una molécula con forma de hongo con una inclinación flexural. La cadena pesada (μ) de IgM contiene cinco sitios de glicosilación ligados a N: Asn-171, Asn-332, Asn-395, Asn-402 y Asn-563.

La inmunoglobulina A (IgA), como la mayor clase de anticuerpo presente en las secreciones mucosas de la mayoría de los mamíferos, representa una primera línea clave de defensa contra la invasión mediante patógenos inhalados e ingeridos. La IgA también se encuentra a concentraciones considerables en el suero de muchas especies, donde funciona como una segunda línea de defensa que media la eliminación de patógenos que han traspasado la superficie 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 de región constante pesada (C α) de IgA que dan lugar a dos subclases, IgA1 e IgA2. La diferencia principal 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 se encuentra ausente en IgA2. IgA tiene la capacidad de formar dímeros, en los que dos unidades de monómeros, donde cada uno comprende dos cadenas pesadas y cadenas ligeras, se postulan para ser dispuestas en una configuración de extremo a extremo estabilizada por puentes disulfuro y la incorporación de una cadena J. La IgA dimérica, producida localmente en sitios mucosos, se transporta a través del límite celular epitelial y hacia afuera de las secreciones mediante interacción con el receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR). Durante este proceso, el pIgR se escinde y el fragmento principal, denominado componente de secreción (CS), se une de forma covalente al dímero de IgA.

Ambas IgA e IgM poseen una extensión de 18 aminoácidos en el extremo C-terminal llamado la "pieza de cola" (pc). Las piezas de cola de IgM (μ tp) e IgA (α tp) difieren en siete posiciones de aminoácidos. La pieza de cola de IgM e IgA está altamente conservada entre varias especies de animales. El penúltimo residuo de cisteína conservado en las piezas de cola de IgA e IgM ha demostrado estar implicado en la polimerización. Ambas piezas de cola contienen un sitio de adición de carbohidrato unido a N, cuya presencia es requerida para la formación de dímeros en la incorporación de la cadena J e IgA y la formación de pentámeros en IgM. Sin embargo, la estructura y composición de los carbohidratos unidos a N en las piezas de cola difieren, lo que sugiere diferencias en la accesibilidad de los glicanos al procesamiento mediante glicosiltransferasas.

Se han notificado las secuencias de nucleótidos y/o proteínas de cadenas J de humanos, y varias especies de animales vertebrados, tal como la vaca, ratón, aves, anfibios y conejo. La cadena J humana contiene ocho residuos de cisteína, dos (Cys13 y Cys69) están implicados en puentes disulfuro con las cadenas α o μ (en IgA e IgM, respectivamente), y seis están implicados en puentes disulfuro intracatenarios (Cys13: Cys101, Cys72: Cys92, Cys109: Cys134). La estructura de cristal tridimensional de la cadena J no se ha notificado.

Las moléculas de unión de la presente invención incluyen una cadena J que comprende un resto que modula el ADME que modula una o más características ADME de la molécula de unión, sin interferir con la capacidad del anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de unirse a su(s) diana(s) de unión. Una molécula de unión puede ser, por ejemplo, un anticuerpo IgM, un anticuerpo IgA o un anticuerpo híbrido IgG/IgM o IgG/IgA, que contiene una pieza de cola IgM o IgA en la cadena pesada IgG y combina así las propiedades de IgG e IgA o IgA, incluida la capacidad de incorporar y formar polímeros con una cadena J modificada cuyo resto que modula ADME modula una característica ADME de la molécula de unión. Para detalles adicionales en anticuerpos híbridos de IgG/IgM e IgG/IgA, véase, por ejemplo Koteswara et al., *Clinical Immunology* 2001, 101(1):21-31. En la FIG. 5 se ilustra un ejemplo de molécula de unión de acuerdo con aspectos de la invención. La molécula de unión representada comprende un pentámero IgM con especificidad de unión para un antígeno diana, y comprende un resto que modula el ADME unida a la cadena J.

un resto que modula el ADME de acuerdo con las realizaciones de la invención puede incluir, sin limitación, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, moléculas similares a anticuerpos, fragmentos de moléculas similares a anticuerpos de unión a antígeno, proteínas, ligandos y receptores. Se subraya que cualquier tipo de resto que modula ADME puede introducirse en una cadena J, siguiendo las enseñanzas de la presente divulgación, seleccionando adecuadamente la ubicación y el tipo de adición (por ejemplo, fusión directa o indirecta, unión química, etc.).

En algunas realizaciones, una molécula de unión comprende una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 10. En algunas realizaciones, una molécula de unión comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 10, por ejemplo, tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, tiene aproximadamente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, o aproximadamente 99,9% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos que se enumera en la Tabla 10.

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

En otra realización preferida, un resto que modula el ADME comprende una molécula similar a un anticuerpo, como, por ejemplo, un anticuerpo de dominio humano (dAb), una molécula de reorientación de doble afinidad (DART), un diacuerpo, un diacuerpo, un anticuerpo de doble dominio variable, un anticuerpo de dominio variable apilado, un inmunofármaco modular pequeño (SMIP), un surrocuero, un anticuerpo de dominio de intercambio de cadenas (SEED), un VHH (por ejemplo, una molécula de anticuerpo similar a un camélido) o un TandAb que funciona modulando una característica ADME de la molécula de unión, una molécula de anticuerpo de tipo camélido, o un TandAb que funciona modulando una característica de la molécula de unión.

Se puede introducir un resto que modula el ADME en una secuencia de cadena J nativa en cualquier lugar que permita que el resto que modula el ADME module una característica ADME de la molécula de unión sin interferir con la unión de la molécula IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA receptora a su diana o dianas de unión. Las ubicaciones preferidas se incluyen en o cerca del extremo C-terminal, en o cerca del extremo N-terminal o en una ubicación interna que, basándose en la estructura tridimensional de la cadena J es accesible. En las realizaciones preferidas, un resto que modula el ADME se introduce en una cadena J de secuencia nativa dentro de unos 10 residuos desde el extremo C o dentro de unos 10 residuos de aminoácidos desde el extremo N, donde la cadena J de secuencia nativa es preferiblemente la cadena J humana de SEQ ID NO: 1. En otra realización, se introduce un resto que modula el ADME en la cadena J humana de secuencia nativa de SEQ ID NO: 1 entre los residuos de cisteína 92 y 101 de SEQ ID NO: 1, o en un lugar equivalente de otra cadena J de secuencia nativa. En otra realización, se introduce un resto que modula el ADME en una cadena J de secuencia nativa, tal como una cadena J de SEQ ID NO: 1, en o cerca de un sitio de glicosilación. Más preferiblemente, se introduce un resto que modula el ADME en la secuencia nativa de la cadena J humana de SEQ ID NO: 1 dentro de unos 10 residuos de aminoácidos desde el extremo C-terminal.

La introducción se puede lograr mediante fusión directa o indirecta, es decir, mediante la combinación de

- secuencias de aminoácidos de un resto que modula el ADME en una cadena polipeptídica mediante la combinación en marco de sus secuencias de nucleótidos codificantes, con o sin un enlazador peptídico. El enlazador peptídico (fusión indirecta), si se utiliza, puede tener, por ejemplo, aproximadamente entre 1 y 50, o aproximadamente entre 1 y 40, o aproximadamente entre 1 y 30, o aproximadamente entre 1 y 20, o aproximadamente entre 1 y 10, o aproximadamente entre 10 y 20 residuos de aminoácidos, y puede estar presente en uno o ambos extremos de un resto que modula el ADME que se va a introducir en una secuencia de cadena J. En una realización preferida, el enlazador peptídico tiene alrededor de 10 a 20, o 10 a 15 aminoácidos de largo. En otra realización preferida, el enlazador peptídico tiene 15 aminoácidos de largo.
- 10 La introducción puede llevarse a cabo por fusión directa o indirecta, es decir, por la combinación de secuencias de aminoácidos de un resto que modula el ADME en una cadena polipeptídica mediante la combinación dentro del marco de sus secuencias de nucleótidos codificantes, con o sin un enlazador peptídico. Estos agentes reticulantes se pueden utilizar en un procedimiento de una etapa o se pueden utilizar para crear proteínas activadas, que usualmente se pueden preservar y reaccionar con la segunda biomolécula en una etapa separada. Así, por ejemplo, puede utilizarse un reactivo reticulante heterobifuncional para formar conjugados entre una cadena J y un resto moduladora de la ADME. Los grupos reactivos incluyen, sin limitación, grupos reactivos imina (como NHS o sulfo-NHS), grupos maleimida, y similares. Tales agentes reticulantes, que pueden ser escindibles o no escindibles, se han utilizado, por ejemplo, en la formación de proteínas portadoras de hapteno y en la preparación de conjugados de enzimas-anticuerpos. Químicamente, los agentes reticulantes escindibles incluyen específicamente, sin limitación, enlazadores de péptidos, hidrazona y a base de disulfuro. Un enlazador bien conocido y muy estudiado es el enlazador valina-citrulina, pero también se conocen y son adecuados otros enlazadores peptídicos. Los representantes típicos de los enlazadores no escindibles incluyen tioéteres, tales como SMCC (*N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato). Para detalles adicionales véase, por ejemplo Ducry L y Stump B, *Bioconjugate Chem.* 2010, 21:5-13. Para listados de enlazadores adecuados adicionales véase, por ejemplo, Klein et al., *Protein Engineering, Design & Selection*; 2014, 27(10): 325-330.

En algunas realizaciones, una cadena J modificada comprende un el resto que modula el ADME extraño. En algunas realizaciones, una cadena J modificada comprende más de un el resto que modula el ADME. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se introduce un resto que modula el ADME en una cadena J modificada, ya sea en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal. En algunas realizaciones, se introduce un el resto que modula el ADME en una cadena J modificada en el extremo N, y se introduce un segundo resto que modula ADME en la misma cadena J modificada en el extremo C terminal. En algunas realizaciones, se introduce un resto que modula el ADME en una cadena J modificada, y se introduce un resto de unión en la misma cadena J modificada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se introduce un el resto que modula el ADME en una cadena J modificada en el extremo N, y se introduce un resto de unión (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de unión a CD3, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo scFv de unión a CD3) en la misma cadena J modificada en el extremo C terminal. En algunas realizaciones, se introduce un resto que modula el ADME en una cadena J modificada en el extremo C-terminal, y un resto de unión (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de unión a CD3, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo scFv de unión a CD3) se introduce en la misma cadena J modificada en el extremo N-terminal. Una molécula de unión que comprende un resto de unión tanto en el extremo N-terminal como en el extremo C-terminal de la cadena J se denomina en este documento una molécula de unión que comprende una cadena J "bidentada".

- 45 La cadena J modificada puede producirse mediante técnicas bien conocidas de tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, expresando un ácido nucleico que codifica la cadena J modificada en un organismo huésped procariota o eucariota adecuado, como células CHO o E. coli. Por tanto, la cadena J modificada, por ejemplo, puede expresarse en E. coli, como se describe por Symersky et al., *Mol Immunol* 2000, 37:133-140.
- 50 En una realización, la cadena J puede modificarse inicialmente mediante la inserción de un sitio de reconocimiento enzimático, y modificarse postraduccionalmente mediante un enlazador peptídico o no peptídico, que puede unir a la cadena J cualquier resto que modula ADME extraño.

La cadena J modificada también se puede expresar conjuntamente con las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA receptor. Aunque debido a su compleja estructura, la producción a gran escala de IgM recombinante ha sido difícil, se han descrito varios sistemas de producción recombinante de IgM utilizando células no linfoides, incluyendo la coexpresión de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de IgM en células de glioma C6, células CHO y células HeLa (véase, por ejemplo, WO89/01975 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, por ejemplo, en Azuma et al., *Clin Cancer Res* 2007, 13(9):2745-2750. La producción de IgM en una línea celular inmortalizada de la retina humana que expresa las proteínas E1A y E1B de un adenovirus se describe en la publicación de solicitud de EE. UU. n.º 20060063234.

- El anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA receptor puede ser monoespecífico, biespecífico o multiespecífico. Las moléculas de unión de IgM e IgA biespecíficas y multiespecíficas, incluyendo los anticuerpos, se describen, por ejemplo, en las publicaciones PCT No. WO2015053887A1 y WO2015120474A1.

Una molécula de unión sujeto puede unirse a cualquier diana de unión a través del anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA, mientras que un el resto que modula el ADME ubicada en la cadena J modula una o más características de ADME de la molécula de unión. De este modo, las moléculas de unión pueden utilizarse para proporcionar una unión de alta avidez a una diana a la que se dirige el anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA, mientras que el resto que modula el ADME de la cadena J modula una o más características ADME de la molécula de unión. En este documento se describen diferentes tipos de los restos que modulan ADME, así como diferentes clases de dianas que pueden ser la diana de una porción de anticuerpo de una molécula de unión en un sujeto.

Restos que modulan ADME que reducen el aclaramiento

Los aspectos de la invención incluyen moléculas de unión que tienen un resto que modula el ADME que reduce la eliminación de una molécula de unión de la circulación de un sujeto, aumentando así la vida media de la molécula de unión en el sujeto. La unión de albúmina es conocida en la materia como una estrategia general para mejorar la farmacocinética de una proteína. Por ejemplo, se ha mostrado que la asociación no covalente con la albúmina prolonga la vida media de las proteínas de vida corta. *Por ejemplo*, Dennis, Mark S. et al., J. Biol. Chem., 2002, 277:35035-35043. Como tales, el uso de albúmina (albúmina sérica humana), proteínas similares a la albúmina, péptidos de unión a albúmina, moléculas de anticuerpos de unión a albúmina (por ejemplo, fragmentos de anticuerpos scFv de unión a albúmina) como restos que modulan ADME en una molécula de unión sujeta proporciona una estrategia eficaz para manipular la farmacocinética de una molécula de unión. Además, se sabe que el receptor de Fc neonatal (FcRn) proporciona una vía de reciclaje que proporciona a las moléculas de inmunoglobulina una vida media circulante más prolongada. *Por ejemplo*, Roopenian D.C. et al., Nature Reviews Immunology 7, 715-725 (2007). Como tal, el uso de proteínas de unión a FcRn, dominios Fc que se unen a FcRn, o restos de anticuerpos que se unen a FcRn, también proporcionan una estrategia eficaz para manipular la farmacocinética de una molécula de unión. Sin limitarse a la teoría, en algunas realizaciones, los restos que modulan ADME que se unen a FcRn proporcionan una vida media extendida al acceder a una vía de reciclaje mediada por FcRn, en lugar de simplemente proporcionar una vida media extendida debido a un aumento en el peso molecular del compuesto de unión.

En algunas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende una proteína de albúmina. Las proteínas albúminas son proteínas solubles no glicosiladas que se encuentran comúnmente en el plasma sanguíneo. Se sabe que las proteínas albúminas interactúan con la vía de reciclaje mediada por FcRn y, como resultado, tienen una vida media circulatoria extraordinariamente larga.

En ciertas realizaciones, un resto que modula el ADME se une a una proteína albúmina, conectándose así a una proteína albúmina y aprovechando la vía de reciclaje mediada por FcRn. Como tal, en ciertas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un péptido de unión a albúmina. Ejemplos no limitantes de péptidos de unión a albúmina se describen en la Publicación de Patente de EE.UU. No. US20050287153. En algunas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión a albúmina. Ejemplos no limitantes de anticuerpos que se unen a la albúmina incluyen scFv antialbúmina, VHH antialbúmina, scFab antialbúmina y dAb antialbúmina.

En algunas realizaciones, un resto moduladora de la ADME comprende un péptido de unión al FcRn. En ciertas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión a FcRn. En algunas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina que está unida a un receptor FcRn. A continuación, en la Tabla 1, se proporcionan ejemplos no limitantes de restos que modulan el ADME que reducen el aclaramiento de una molécula de unión. En la Tabla 1, se proporcionan ejemplos no limitantes de proteínas que se pueden utilizar para generar un resto de anticuerpo que se puede utilizar como resto que modula el ADME en las moléculas de unión en un sujeto.

Tabla 1: Información de la secuencia para restos que modulan ADME

Restos que modulan ADME	Información sobre la secuencia de aminoácidos
Albúmina	N.º de acceso a GenBank: NP_000468.1
Péptido de unión a albúmina	DLCLRDWGCLW (SEQ ID NO: 2)
Péptido de unión a albúmina	DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 3)
Péptido de unión a albúmina	MEDICLPRWGCLWGD (SEQ ID NO: 4)
Péptido de unión a albúmina	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE (SEQ ID NO: 5)
Péptido de unión a albúmina	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV (SEQ ID NO: 6)
Péptido de unión a albúmina	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK (SEQ ID NO: 7)

Restos que modulan ADME	Información sobre la secuencia de aminoácidos
Péptido de unión a albúmina	EDICLPRWGCLWEDD (SEQ ID NO: 8)
Péptido de unión a albúmina	RLMEDICLPRWGCLWEDD (SEQ ID NO: 9)
Péptido de unión a albúmina	MEDICLPRWGCLWEDD (SEQ ID NO: 10)
Péptido de unión a albúmina	MEDICLPRWGCLWED (SEQ ID NO: 11)
Péptido de unión a albúmina	RLMEDICLARWGCLWEDD (SEQ ID NO: 12)
Péptido de unión a albúmina	EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG (SEQ ID NO: 13)
Péptido de unión a albúmina	RAPESFVCYWETICFERSEQ (SEQ ID NO: 14)
Péptido de unión a albúmina	EMCYFPGICWM (SEQ ID NO: 15)
FcRn	N.º de acceso a GenBank: P55899.1
Dominio Fc de IgG1	N.º de acceso a GenBank: AAB24269.1
Dominio Fc de IgG2	N.º de acceso a GenBank: AAR26706.1
Dominio Fc de IgG3	N.º de acceso a GenBank: ACO54886.1
Dominio Fc de IgG4	N.º de acceso a GenBank: AAG00912.1

Restos que modulan ADME que mejoran la penetración de la barrera hematoencefálica

5 Los aspectos de la invención incluyen moléculas de unión que tienen un resto que modula el ADME que mejora la capacidad de una molécula de unión para penetrar la barrera hematoencefálica de un sujeto, aumentando así la concentración de la molécula de unión en el líquido extracelular del cerebro y el sistema nervioso central. La barrera hematoencefálica está formada por células endoteliales del cerebro, que están conectadas por uniones estrechas. La barrera hematoencefálica permite el transporte selectivo de ciertas moléculas al líquido extracelular del cerebro y al sistema nervioso central, mientras que niega el paso a otras.

10 Los aspectos de la invención incluyen moléculas de unión que tienen un resto que se une a una o más dianas en una vía de transcitos mediada por receptor (RMT), facilitando así el transporte de una molécula de unión a través de la barrera hematoencefálica. Ejemplos específicos no limitantes de dianas de unión que están asociados con una vía RMT incluyen: transferrina, receptor de transferrina, insulina, receptor de insulina, IGF-1, receptor de IGF-1, leptina, receptor de leptina, basigina, Glut1 y CD98hc. Se sabe en la técnica que las vías RMT facilitan el paso de sus respectivos ligandos a través de la barrera hematoencefálica y hacia el líquido extracelular del cerebro y el sistema nervioso central de un sujeto mamífero. *Por ejemplo*, Dennis et al., Neuropsychopharmacology Reviews (2012) 37, 302-303; Joy Yu Zuchero et al., Neuron 89, 70-82 (2016). Como tal, el uso de restos de unión de RMT (por ejemplo, restos de anticuerpos que se unen a una diana de la vía RMT (por ejemplo, un receptor de superficie celular asociado a RMT y/o su ligando asociado)) como restos que modulan el ADME en una molécula de unión en un sujeto proporciona una estrategia eficaz para mejorar la penetración de la barrera hematoencefálica y aumentar la concentración de la molécula de unión en el líquido extracelular del cerebro y el sistema nervioso central. Los ejemplos no limitantes de restos de anticuerpos que pueden unirse a una diana de la vía RMT incluyen los restos scFv, VHH, scFab y dAb.

25 En algunas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo que se une a un receptor en una vía RMT. En algunas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo que se une a un ligando en una vía RMT. En algunas realizaciones, una el resto que modula el ADME comprende un ligando, o una porción de un ligando que es capaz de unirse a un receptor, en una vía RMT (por ejemplo, comprende una proteína transferrina, o comprende al menos una porción de una proteína transferrina que es capaz de unirse a un receptor de transferrina).

35 En algunas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión al receptor de transferrina (por ejemplo, un scFv de unión al receptor de transferrina). En algunas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión a transferrina (por ejemplo, un scFv de unión a transferrina). En ciertas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión al receptor de insulina (por ejemplo, un scFv de unión al receptor de insulina). En ciertas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión a insulina (por ejemplo, un scFv de unión a insulina). En ciertas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión al receptor de IGF-1 (por ejemplo, un scFv de unión al receptor de IGF-1). En ciertas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión a IGF-1 (por ejemplo, un scFv de unión a IGF-1). En ciertas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión al receptor de leptina (por ejemplo, un scFv de unión al receptor de leptina). En ciertas realizaciones, un resto

que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión a leptina (por ejemplo, un scFv de unión a leptina). En algunas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión a basigina (por ejemplo, un scFv de unión a basigina). En algunas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión a Glut1 (por ejemplo, un scFv de unión a Glut1). En algunas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión a CD98hc (por ejemplo, un scFv de unión a CD98hc).

En algunas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende una proteína transferrina. En algunas realizaciones, el resto que modula el ADME comprende una proteína IGF-1. En algunas realizaciones, el resto que modula el ADME comprende una proteína de leptina. En algunas realizaciones, el resto que modula el ADME comprende una proteína de basignina. En algunas realizaciones, el resto que modula el ADME comprende una proteína Glut1. En algunas realizaciones, el resto que modula el ADME comprende una proteína CD98hc. En la Tabla 2 se proporcionan ejemplos no limitantes de proteínas que se pueden usar para generar un resto de anticuerpo que se puede usar como un resto que modula el ADME que mejora la penetración de la barrera hematoencefálica.

Tabla 2: Información de la secuencia para restos que modulan ADME

Restos que modulan ADME	N.º de acceso al registro de GenBank
Receptor de transferrina	AAA61153.1
Receptor de insulina	P06213.4
Receptor de IGF-1	P08069.1
Receptor de leptina	P48357.2
Transferrina	AAB22049.1
Leptina	AAH69452.1
Insulina	AAA59172.1
IGF-1	CAA01954.1
Basigina	BAA08109.1
Glut1	P11166.2
CD98hc (cadena pesada del antígeno de superficie celular 4F2)	P08195.3

20 Restos que modulan ADME que aumentan la vida media en espacios extravasculares

Los aspectos de la invención incluyen moléculas de unión que tienen un resto que modula el ADME que aumenta la vida media de una molécula de unión en un espacio extravascular de un sujeto. Las proteínas terapéuticas que se administran directamente a espacios extravasculares, tales como los espacios intraarticulares o los espacios intravítreos, suelen tener una vida media característicamente corta en el espacio extravascular. *Por ejemplo*, Mordenti, J. et al., Toxicological Sciences 52, 101-106 (1999); Mordenti, J. et al., Toxicological Sciences 27(5), 536-544 (1999).

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano aniónico, no sulfatado, que es un componente principal de la matriz extracelular en ciertos espacios extravasculares, como los tales espacios intraarticulares y los espacios intravítreos. Como tal, el uso de compuestos que se unen al ácido hialurónico como restos que modulan ADME proporciona una estrategia eficaz para retener una molécula terapéutica en dicho espacio extracelular. La estructura del ácido hialurónico se proporciona en la FIG. 15.

La proteína del gen 6 inducible por el factor de necrosis tumoral (TSG-6) es una proteína secretada de 30 kDa que contiene un dominio de unión al hialuronano. El dominio de unión de hialuronano interactúa con la matriz extracelular en espacios extravasculares y está involucrado en la migración celular. Como tal, el uso de TSG-6 como un resto que modula el ADME proporciona una estrategia eficaz para retener una molécula terapéutica en un espacio extracelular.

En algunas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende una proteína de unión al ácido hialurónico (HABP). En algunas realizaciones, el resto que modula el ADME comprende una proteína TSG-6. En ciertas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión a ácido hialurónico. En ciertas realizaciones, un resto que modula el ADME comprende un resto de anticuerpo de unión a TSG-6. Ejemplos no limitantes de restos de anticuerpos incluyen restos de scFv, VHH, scFab y dAb. A continuación, en la Tabla 3, se proporcionan ejemplos no limitantes de restos que modulan el ADME que retienen una molécula de unión en un espacio extracelular.

Tabla 3: Información de la secuencia para restos que modulan ADME

Restos que modulan ADME	Información sobre la secuencia de aminoácidos
Proteína de unión de ácido hialurónico (HABP)	N.º de acceso a GenBank: 2207280A
TSG-6	N.º de acceso a GenBank: CAD13434.1

5 Dianas antagonistas

Los aspectos de la invención incluyen moléculas de unión que tienen un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T. Las vías de señalización inhibitoria de células T son conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, las descritas en *Pardoll* et al. Los ejemplos no limitantes de vías de señalización inhibitoria de células T y componentes de las mismas se describen con más detalle a continuación.

Un ejemplo de vía de señalización inhibitoria de células T es la vía de señalización que implica la muerte celular programada-1 (PD-1) y su ligando, el ligando de muerte celular programada-1 (PD-L1). La PD-1 es una proteína receptora inhibitoria de la superficie celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas y participa en la regulación de la función de las células T en la inmunidad y la auto-tolerancia. El PD-L1 interactúa con PD-1 en la superficie de las células T e inhibe la proliferación de las células T bloqueando la progresión del ciclo celular y la producción de citocinas. *Id.*

Otro ejemplo de vía de señalización inhibitoria de células T es la vía de señalización en la que intervienen la inmunoglobulina de células T y el dominio de mucina 3 (TIM3). TIM3 es una glicoproteína de la superficie celular que se expresa en la superficie de las células T y funciona como una molécula inhibitoria que interviene en la terminación de las células Th1. *Id.*

Otro ejemplo de vía de señalización inhibitoria de células T es la vía de señalización que implica al gen de activación linfocitaria 3 (LAG3). LAG3 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y funciona como inhibidor de la proliferación celular, activación y homeostasis de las células T. *Id.*

Como se revisó anteriormente, las moléculas de unión en un sujeto comprenden una cadena J que comprende un resto que modula el ADME. En algunas realizaciones, un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a una diana que participa en una vía de señalización inhibitoria de células T y antagoniza la vía de señalización inhibitoria, bloqueando o disminuyendo así las señales inhibitorias que recibe una célula T a través de la vía, mientras que el resto que modula el ADME de la cadena J modula una característica ADME de la molécula de unión. Debido a su mayor avidez, los anticuerpos de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA en un sujeto actúan de forma más efectiva como antagonistas cuando se dirigen contra dianas de la vía de señalización inhibitoria de células T, en comparación con los anticuerpos IgG, que solo tienen dos sitios de unión. Como resultado, la respuesta inmunitaria de las células T no se bloquea, detiene o disminuye o, al menos, la inhibición de la respuesta inmunitaria de las células T se reduce o disminuye. El anticuerpo de una molécula de unión en un sujeto se puede usar para antagonizar cualquier vía de señalización inhibitoria de células T, que incluye, pero no se limita a, las vías de señalización inhibitoria que implican las proteínas enumeradas en la Tabla 4, a continuación. Los números de acceso al registro de GenBank correspondientes a las secuencias de proteínas humanas de estas dianas de la vía de señalización inhibitoria de células T se proporcionan en la Tabla 4, a continuación.

Tabla 4: Información de la secuencia para las dianas de la vía de señalización estimuladora de células T

Miembro de la vía de señalización estimuladora de células T	N.º de acceso al registro de GenBank
PD-1	AAC51773.1
PD-L1	Q9NZQ7.1
TIM3	AAL65158.1
LAG3	AAH52589.1

Dianas agonistas

Los aspectos de la invención incluyen moléculas de unión que tienen un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que agoniza una vía de señalización estimuladora de células T. Las vías de señalización estimuladora de células T son conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, las descritas en *Pardoll* et al. Los ejemplos no limitantes de las vías de señalización estimuladora de células T y componentes de las mismas se describen con más detalle a continuación.

El CD137 pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R) y se expresa en la superficie de las células T. Su función es estimular la proliferación de células T y la secreción de citocinas. *Por ejemplo*, Pardoll en 254. OX40 es otro miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral que se expresa en las células T y funciona enviando una señal estimulante a las células T que ayuda a mantener la respuesta inmune a lo largo del tiempo. *Id.*

Otra vía de señalización estimuladora de las células T involucra al CD40. El CD40 pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y se expresa en las células presentadoras de antígenos. El compromiso de CD40 con su ligando CD40L da como resultado varias señales estimulantes de células T. *Id.*

Otra vía de señalización estimuladora de células T implica la proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR). El GITR pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y se expresa en las células T. Funciona aumentando la proliferación de células T, la activación y la producción de citocinas. *Por ejemplo*, Nocentini, G. et al., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 10 de junio de 1997; 94(12):6216-21.

CD27 es otra proteína que participa en una vía de señalización estimuladora de las células T. Otro miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, el CD27 se expresa en la superficie de las células T y funciona enviando una señal estimulante a las células T cuando interactúa con el CD70. *Por ejemplo*, Pardoll en 254.

Otra vía de señalización estimuladora de células T implica el mediador de entrada del virus del herpes (HVEM). El HVEM pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y se expresa en la superficie de las células presentadoras de antígenos. Cuando HVEM interactúa con ciertos ligandos, como CD258, envía una señal estimulante a las células T. *Id.*

Como se revisó anteriormente, las moléculas de unión en un sujeto comprenden un resto que modula el ADME en la cadena J que modula una característica de ADME de la molécula de unión. En algunas realizaciones, un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a una diana que participa en una vía de señalización estimuladora de células T y agoniza la vía de señalización estimuladora, manteniendo o aumentando así las señales estimuladoras que recibe una célula T a través de la vía, mientras que el resto que modula el ADME de la cadena J modula una característica ADME de la molécula de unión. Debido a su mayor avidez, los anticuerpos de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA en un sujeto actúan más eficazmente como agonistas cuando se dirigen contra dianas de la vía de señalización estimuladora de células T, en comparación con los anticuerpos de IgG, que solo tienen dos sitios de unión. Como resultado, la respuesta inmunitaria de una célula T se mantiene o aumenta. Se puede usar un anticuerpo de una molécula de unión en un sujeto para agonizar cualquier vía de señalización estimuladora de células T, que incluye, pero no se limita a, las vías de señalización estimuladora que implican las proteínas enumeradas en la Tabla 5, a continuación. Los números de acceso al registro de GenBank correspondientes a las secuencias de proteínas humanas de estas dianas de la vía de señalización estimuladora de células T se proporcionan en la Tabla 5, a continuación.

Tabla 5: Información de la secuencia para las dianas de la vía de señalización estimuladora de células T

Miembro de la vía de señalización estimuladora de células T:	N.º de acceso al registro de GenBank
CD137 (4-1BB)	NP_001552.2
OX40	CAE11757.1
CD40	P25942.1
GITR	Q9Y5U5.1
CD27	P26842.2
HVEM	AAQ89238.1

Otros ejemplos no limitantes de vías de señalización estimuladoras de células T incluyen las mediadas por: TNFR1 (DR1) (N.º de acceso a GenBank. P19438.1); TNFR2 (N.º de acceso a GenBank. P20333.3); Fas (CD95, Apo1, DR2) (N.º de acceso a GenBank. AAH12479.1); CD30 (N.º de acceso a GenBank. AAA51947.1); TRAILR1 (DR4, Apo2) (N.º de acceso a GenBank. O00220.3); DR5 (TRAILR2) (N.º de acceso a GenBank. 014763.2); TRAILR3 (DcR1) (N.º de acceso a GenBank. 014798.3); TRAILR4 (DcR2) (N.º de acceso a GenBank. Q9UBN6.1); OPG (OCIF) (N.º de acceso a GenBank. O00300.3); TWEAKR (FN14) (N.º de acceso a GenBank. Q9NP84.1); DcR3 (N.º de acceso a GenBank. 095407.1); DR3 (N.º de acceso a GenBank. AAQ88676.1); EDAR (N.º de acceso a GenBank. Q9UNE0.1); y XEDAR (N.º de acceso a GenBank. AAQ89952.1). Véase, *por ejemplo*, Aggarwal et al., Blood, 119:651-665, 2012. En algunas realizaciones, un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a cualquiera de estas dianas y agoniza una vía de señalización

estimuladora de células T, manteniendo o aumentando así las señales estimuladoras que recibe una célula T a través de la vía, mientras que el resto que modula el ADME de la cadena J modula una característica de ADME de la molécula de unión.

5 Dianas de expresión de bajo nivel

Los aspectos de la invención incluyen moléculas de unión que tienen un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que se une a una diana de expresión de bajo nivel. Debido a su mayor avidez, las moléculas de unión en un sujeto son más potentes que los anticuerpos IgG. Como tal, las moléculas de unión en un sujeto se pueden emplear en entornos donde una diana de unión particular se expresa a un nivel bajo, y donde una mayor avidez es beneficiosa para facilitar la unión entre un anticuerpo y una diana. Puede usarse un anticuerpo de una molécula de unión en un sujeto para dirigirse a cualquier diana de expresión de bajo nivel. Ejemplos específicos de dianas de expresión de bajo nivel que pueden ser dirigidas por un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de las moléculas de unión en un sujeto incluyen, sin limitación, EGFR, HER2, HER3, EpCAM, CEACAM, Gp100, MAGE1 y PD-L1. Los números de acceso al registro GenBank correspondientes a las secuencias de proteínas humanas de estas dianas se proporcionan en la Tabla 6, a continuación.

Tabla 6: Información de la secuencia para dianas de expresión de bajo nivel

Nombre de diana	N.º de acceso al registro de GenBank
EGFR	AAI18666.1
HER2	P04626.1
HER3	P21860.1
EpCAM	P16422.2
CEACAM	P06731.3
Gp100	AAC60634.1
MAGE1	NP_004979.3
PD-L1	Q9NZQ7.1

20 Dianas de baja afinidad

Los aspectos de la invención incluyen moléculas de unión que tienen un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que se une a una diana de baja afinidad. Debido a su mayor avidez, las moléculas de unión en un sujeto son más potentes que los anticuerpos IgG. Como tal, las moléculas de unión en un sujeto se pueden emplear en entornos donde una diana de unión particular tiene una afinidad de unión baja y donde una mayor avidez es beneficiosa para facilitar la unión entre un anticuerpo y una diana. Puede usarse un anticuerpo de una molécula de unión en un sujeto para dirigirse a cualquier diana de baja afinidad. Ejemplos específicos de dianas de baja afinidad que pueden ser dirigidas por un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de las moléculas de unión en un sujeto incluyen, sin limitación, NY-ESO-1, antígeno Sialyl Lewis X y antígeno Tn. Los números de acceso GenBank correspondientes a las secuencias de proteínas humanas del antígeno NY-ESO-1 y del antígeno Sialyl Lewis X se proporcionan en la Tabla 7, a continuación. La estructura del antígeno Tn se proporciona en la FIG. 14.

35 Tabla 7: Información de la secuencia para dianas de baja afinidad

Nombre de diana	N.º de acceso al registro de GenBank
NY-ESO-1	CAA05908.1
Antígeno Sialyl Lewis X	NP_001241688.1

40 Dianas de cáncer hematológico

Los aspectos de la invención incluyen moléculas de unión que tienen un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que se une a una diana de cáncer hematológico. Debido a su mayor avidez, las moléculas de unión en un sujeto son más potentes que los anticuerpos IgG. Como tal, las moléculas de unión en un sujeto se pueden emplear en entornos donde una diana de unión particular se expresa a un nivel bajo, como es el caso de ciertos cánceres hematológicos. La mayor avidez de las moléculas de unión en un sujeto facilita la unión entre un anticuerpo y una diana. Se puede usar un anticuerpo de una molécula de unión en un sujeto para

- 5 dirigir cualquier diana de unión, como una diana de expresión de bajo nivel en una célula cancerosa hematológica. Ejemplos específicos de dianas de cáncer hematológico que pueden ser dirigidas por un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de las moléculas de unión en un sujeto incluyen, sin limitación, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52 y CD70. Los números de acceso al GenBank correspondientes a las
- 5 secuencias de proteínas humanas de estas dianas figuran en la Tabla 8, a continuación.

Tabla 8: Información de la secuencia para dianas de cáncer hematológico

Nombre de diana	N.º de acceso al registro de GenBank
CD19	AAA69966.1
CD20	NP_690605.1
CD22	P20273.2
CD33	P20138.2
CD38	BAA18966.1
CD52	AJC 19276.1
CD70	NP_001243.1

10 Otras dianas de unión

- Aspectos de la invención incluyen moléculas de unión que tienen un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que se une a una diana que está asociada con una enfermedad o trastorno particular. Debido a su mayor
- 15 avidez, las moléculas de unión en un sujeto son más potentes que los anticuerpos IgG. Como tal, las moléculas de unión en un sujeto se pueden emplear en entornos donde es deseable una unión de alta avidez a una diana de unión particular. Un anticuerpo de una molécula de unión a un sujeto puede utilizarse para dirigirse a cualquier diana de unión. Los ejemplos específicos de dianas de unión que pueden ser la diana de un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de las moléculas de unión en un sujeto incluyen, sin limitación, las
- 20 proteínas VEGF, TNF-alfa, beta amiloide y Beta-secretasa 1 (BACE). Los números de acceso al registro GenBank correspondientes a las secuencias de proteínas humanas de estas dianas se proporcionan en la Tabla 9, a continuación.

Tabla 9: Información de la secuencia para otras dianas de unión

Nombre de diana	N.º de acceso al registro de GenBank
VEGF	AAP86646.1
TNF alfa	CAA26669.1
Beta amiloide A4	P05067.3
BACE (Beta-secretasa 1)	P56817.2

25 Aplicaciones de la unión de moléculas con restos que modulan ADME

- Las moléculas de unión que comprenden una cadena J modificada que comprende un resto que modula el ADME tienen aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico generalizadas, que incluyen, pero no se limitan a, el
- 30 tratamiento de diversas enfermedades mediante la modulación de una o más características de ADME de una molécula de unión.

- En algunas realizaciones, las moléculas de unión al sujeto que comprenden una cadena J modificada pueden utilizarse ampliamente para el tratamiento de cualquiera de una variedad de cánceres. Se anticipa que se
- 35 puede elegir como diana cualquier tipo de tumor y cualquier tipo de antígeno asociado a tumores por las moléculas de unión en un sujeto. Ejemplo de tipos de cáncer incluyen, sin limitación, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, cáncer biliar, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer esofágico, gástrico, de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, cáncer de pulmón, cáncer medular de tiroides, linfoma no-Hodgkin,
- 40 mieloma múltiple, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, glioma, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de próstata y cáncer de vejiga urinaria. Sin embargo, el experto en la técnica entenderá que los antígenos asociados a los tumores son conocidos en la técnica para prácticamente cualquier tipo de cáncer.

- En algunas realizaciones, la cadena J de una molécula de unión de un sujeto incluye un resto que modula el ADME que reduce la eliminación de la molécula de unión de la circulación de un sujeto, mientras que el
- 45

anticuerpo antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T. Sin ceñirnos a la teoría, el propósito de una molécula de unión de este tipo es aumentar la semivida de la molécula de unión a través de la molécula moduladora de la ADME de la cadena J, al tiempo que se bloquea o disminuye la señalización inhibidora de las células T a través del anticuerpo. Debido a su mayor avidez, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA del sujeto actúan como antagonistas eficaces cuando se dirigen a ciertas dianas de unión, como los miembros de una vía de señalización inhibidora de células T, como se ha descrito anteriormente. Tales moléculas de unión encuentran utilidad, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades en las que es deseable bloquear o disminuir la inhibición de una respuesta inmunitaria de células T, tal como, por ejemplo, ciertos cánceres y trastornos inmunitarios. Dichos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cánceres epiteliales así como cánceres hematológicos.

Los cánceres epiteliales que son adecuados para el tratamiento con las moléculas de unión al sujeto que tienen un anticuerpo antagonista y un resto moduladora de la ADME en la cadena J incluyen, sin limitación, melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, nasofaríngeo, colorrectal, hepático, de vejiga urinaria, ovárico, gástrico, esofágico, pancreático, renal, de tiroides o de mama, cáncer de mama con receptores hormonales negativos o cáncer de mama triple negativo. Los cánceres hematológicos que son adecuados para el tratamiento con las moléculas de unión del sujeto que tienen un anticuerpo antagonista y un resto que modula el ADME en la cadena J incluyen, sin limitación, leucemia, linfoma, mieloma, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin. En algunas realizaciones, las moléculas de unión en un sujeto encuentran uso en el tratamiento de cualquiera de estas afecciones.

En algunas realizaciones, la cadena J de una molécula de unión en un sujeto incluye un resto que modula el ADME que mejora la penetración de la barrera hematoencefálica por la molécula de unión, mientras que el anticuerpo antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T. Sin limitarse a la teoría, el propósito de dicha molécula de unión es aumentar la concentración de la molécula de unión en el líquido extracelular del cerebro y el sistema nervioso central a través del resto que modula el ADME de la cadena J, mientras que simultáneamente se bloquea o disminuye la señalización inhibidora de las células T a través del anticuerpo. Debido a su mayor avidez, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA del sujeto actúan como antagonistas eficaces cuando se dirigen a ciertas dianas de unión, tal como los miembros de una vía de señalización inhibidora de células T, como se ha descrito anteriormente. Tales moléculas de unión encuentran utilidad, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades en las que es deseable bloquear o disminuir la inhibición de una respuesta inmunitaria de células T, tal como, por ejemplo, ciertos cánceres y trastornos inmunitarios del cerebro y del sistema nervioso central. Dichos cánceres incluyen, pero no se limitan a, glioma, astrocitoma, meningioma, neuroma y oligodendroglioma.

En algunas realizaciones, la cadena J de las moléculas de unión en cuestión incluye un resto que modula el ADME que reduce la eliminación de la molécula de unión de la circulación de un sujeto, mientras que el anticuerpo agoniza una vía de señalización estimuladora de células T. Sin ceñirse a la teoría, el propósito de dicha molécula de unión es aumentar la vida media de la molécula de unión a través del resto que modula el ADME en la cadena J, manteniendo o aumentando simultáneamente la señalización estimuladora de células T a través del anticuerpo. Debido a su mayor avidez, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA del sujeto actúan como superagonistas cuando se dirigen a ciertas dianas de unión, tales como los miembros de una vía de señalización estimuladora de células T, como se ha descrito anteriormente. Tales moléculas de unión encuentran utilidad, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades donde es deseable el mantenimiento o la activación de una respuesta inmunitaria de células T, tales como, por ejemplo, ciertos cánceres y trastornos inmunitarios. Dichos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cánceres epiteliales así como cánceres hematológicos.

Los cánceres epiteliales que son adecuados para el tratamiento con las moléculas de unión al sujeto que tienen un anticuerpo agonista y un resto que modula el ADME en la cadena J incluyen, sin limitación, melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, nasofaríngeo, colorrectal, hepático, de vejiga urinaria, ovárico, gástrico, esofágico, pancreático, renal, de tiroides o de mama, cáncer de mama con receptores hormonales negativos o cáncer de mama triple negativo. Los cánceres hematológicos que son adecuados para el tratamiento con las moléculas de unión al sujeto que tienen un anticuerpo agonista y un resto que modula el ADME en la cadena J incluyen, sin limitación, leucemia, linfoma, mieloma, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin. En algunas realizaciones, las moléculas de unión en un sujeto encuentran uso en el tratamiento de cualquiera de estas afecciones.

En algunas realizaciones, la cadena J de una molécula de unión en un sujeto incluye un resto que modula el ADME que mejora la penetración de la barrera hematoencefálica por la molécula de unión, mientras que el anticuerpo agoniza una vía de señalización inhibidora de células T. Sin ceñirse a la teoría, el propósito de dicha molécula de unión es aumentar la concentración de la molécula de unión en el líquido extracelular del cerebro y el sistema nervioso central a través del resto que modula el ADME en la cadena J, mientras se mantiene o aumenta simultáneamente la señalización de estimulación de células T a través del anticuerpo. Debido a su

mayor avidez, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA del sujeto actúan como superagonistas cuando se dirigen a ciertas dianas de unión, tales como los miembros de una vía de señalización estimuladora de células T, como se ha descrito anteriormente. Estas moléculas de unión encuentran utilidad, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades en las que es deseable el mantenimiento o la activación de una respuesta inmune de células T, tal como, por ejemplo, ciertos cánceres y trastornos inmunes del cerebro y del sistema nervioso central. Dichos cánceres incluyen, pero no se limitan a, glioma, astrocitoma, meningioma y oligodendroglioma.

En algunas realizaciones, la cadena J de una molécula de unión a un sujeto incluye un resto que modula el ADME que aumenta la semivida de la molécula de unión, mientras que el anticuerpo se une a una diana de expresión de bajo nivel. Sin atenerse a la teoría, el propósito de una molécula de unión de este tipo es aumentar la semivida de la molécula de unión a través del resto moduladora de la ADME en la cadena J, mientras que simultáneamente se une a una diana de expresión de bajo nivel utilizando la mayor avidez de los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA del sujeto. Dichas moléculas de unión encuentran utilidad en el tratamiento de enfermedades en las que la unión de alta avidez a una diana de expresión de bajo nivel es beneficiosa, tal como, por ejemplo, en ciertos cánceres y trastornos inmunes. Por ejemplo, se sabe que ciertos cánceres epiteliales expresan antígenos tumorales que tienen un bajo nivel de expresión, como se describió anteriormente. Dichos cánceres epiteliales incluyen, sin limitación, melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, nasofaríngeo, colorrectal, de hígado, de vejiga urinaria, de ovario, gástrico, esofágico, pancreático, renal, de tiroides o de mama, cáncer de mama con receptor hormonal negativo o cáncer de mama triple negativo. En algunas realizaciones, las moléculas de unión en un sujeto se utilizan en el tratamiento de cualquiera de estas afecciones.

En algunas realizaciones, la cadena J de una molécula de unión a un sujeto incluye un resto que modula el ADME que aumenta la semivida de la molécula de unión, mientras que el anticuerpo se une a una diana de expresión de bajo nivel. Sin entrar en teorías, el propósito de una molécula de unión de este tipo es aumentar la semivida de la molécula de unión a través del resto moduladora de la ADME en la cadena J, mientras que simultáneamente se une a una diana de baja afinidad utilizando la mayor avidez de los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA del sujeto. Como se ha indicado anteriormente, debido a su mayor avidez, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA sujetos que comprenden una cadena J modificada que comprende un resto que modula el ADME son especialmente ventajosos en situaciones en las que los anticuerpos IgG se unen a su diana con baja afinidad. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA pueden comprender el dominio de unión de un anticuerpo IgG terapéutico. Dichas moléculas de unión encuentran utilidad en el tratamiento de enfermedades en las que la unión de alta avidez a una diana de baja afinidad es beneficiosa, como por ejemplo, en ciertos cánceres y trastornos inmunes. Por ejemplo, se sabe que ciertos cánceres epiteliales expresan antígenos tumorales que tienen una baja afinidad de unión, como se ha descrito anteriormente. Dichos cánceres epiteliales incluyen, sin limitación, melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, nasofaríngeo, colorrectal, de hígado, de vejiga urinaria, de ovario, gástrico, esofágico, pancreático, renal, de tiroides o de mama, cáncer de mama con receptor hormonal negativo o cáncer de mama triple negativo. En algunas realizaciones, las moléculas de unión en un sujeto son para su uso en el tratamiento de cualquiera de estas afecciones.

En algunas realizaciones, la cadena J de una molécula de unión en un sujeto incluye un resto que modula el ADME que aumenta la vida media de la molécula de unión, mientras que el anticuerpo se une a una diana en una célula cancerosa hematológica. Sin limitarse a la teoría, el propósito de dicha molécula de unión es aumentar la vida media de la molécula de unión a través del resto que modula el ADME en la cadena J, mientras que simultáneamente se une a una diana de cáncer hematológico utilizando la mayor avidez de los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA del sujeto. Dichas moléculas de unión son útiles en el tratamiento de cánceres hematológicos en donde la unión con gran avidez a un antígeno tumoral resulta beneficiosa. Por ejemplo, se sabe que ciertos cánceres hematológicos expresan antígenos tumorales a un nivel bajo, como se describió anteriormente. Dichos cánceres hematológicos incluyen, sin limitación, leucemia, linfoma, mieloma, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin. En algunas realizaciones, las moléculas de unión en un sujeto encuentran uso en el tratamiento de cualquiera de estas afecciones.

En algunas realizaciones, la cadena J de una molécula de unión en un sujeto incluye un resto que modula el ADME que aumenta la retención de la molécula de unión en un espacio extravascular, mientras que el anticuerpo se une a una diana de unión en el espacio extravascular. Sin limitarse a la teoría, el propósito de dicha molécula de unión es aumentar el tiempo de residencia de la molécula de unión en el espacio extravascular a través del resto que modula el ADME en la cadena J, mientras que simultáneamente se une a una diana de unión utilizando la mayor avidez de los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA del sujeto. Dichas moléculas de unión son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en donde resulta beneficiosa la unión con gran avidez a una diana de unión en un espacio extravascular. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) es una diana de unión en el tratamiento de la artritis reumatoide, que es una enfermedad autoinmune que afecta a las articulaciones de un sujeto. Las moléculas de unión en un sujeto encuentran uso en el tratamiento de la artritis reumatoide al proporcionar una unión de alta avidez al TNF alfa a través del anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA, mientras que también proporcionan un tiempo de retención extendido

dentro de un espacio intraarticular a través del resto que modula el ADME en la cadena J modificada.

En otro ejemplo no limitante, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una diana de unión en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (ADME), que es una enfermedad que afecta la retina de un sujeto. Las moléculas de unión en cuestión encuentran uso en el tratamiento del ADME al proporcionar una unión de alta avidez a VEGF a través del anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA, al tiempo que proporciona un tiempo de retención extendido en un espacio intravítreo a través del resto que modula el ADME en la cadena J modificada.

En algunas realizaciones, la cadena J de una molécula de unión en un sujeto incluye un resto que modula el ADME que mejora la penetración de la barrera hematoencefálica por la molécula de unión, mientras que el anticuerpo se une a una diana de unión en el líquido extracelular del cerebro o un tejido del sistema nervioso central. Sin ceñirse a la teoría, el propósito de dicha molécula de unión es aumentar la concentración de la molécula de unión en el líquido extracelular del cerebro y en el tejido del sistema nervioso central a través del resto que modula el ADME en la cadena J, mientras se une simultáneamente a una molécula de unión. objetivo utilizando la mayor avidez de los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA del sujeto. Dichas moléculas de unión son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en los que resulta beneficiosa la unión con gran avidez a una diana de unión en el líquido extracelular del cerebro o en el tejido del sistema nervioso central. Por ejemplo, la beta amiloide es una diana de unión en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que es una enfermedad que afecta al sistema nervioso central de un sujeto. La beta secretasa 1 (BACE) también es una diana de unión en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Las moléculas de unión en un sujeto encuentran uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer al proporcionar una unión de alta avidez a, por ejemplo, beta amiloide o BACE a través del anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA, mientras que también proporcionan una mayor concentración de la molécula de unión dentro del fluido extracelular del cerebro o el tejido del sistema nervioso central a través del resto que modula el ADME en la cadena J modificada.

Ejemplos de anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA que incluyen una cadena J modificada que modula una característica ADME de una molécula de unión pueden incluir las regiones de unión de anticuerpos IgG conocidos a antígenos asociados a tumores, tal como, por ejemplo, blinatumomab (también conocido como MT103) (anti-CD19), CD19hA19 (anti-CD19, patente de EE. UU. n.º 7,109,304), hPAM4 (anti-mucina, patente de EE. UU. n.º 7,282,567), hA20 (anti-CD20, patente de EE. UU. n.º 7,251,164), hIMMU31 (anti-AFP, patente de EE. UU. n.º 7,300,655), hLL1 (anti-CD74, patente de EE. UU. n.º 7,312,318), hLL2 (anti-CD22, patente de EE. UU. n.º 7,074,403), hMu-9 (anti-CSAp, patente de EE. UU. n.º 7,387,773), hL243 (anti-HLA-DR, patente de EE. UU. n.º 7,612,180), hMN-14 (anti-CEACAM5, patente de EE. UU. n.º 6,676,924), hMN-15 (anti-CEACAM6, patente de EE. UU. n.º 7,541,440), hRS7 (anti-EGP-1, patente de EE. UU. n.º 7,238,785), hMN-3 (anti-CEACAM6, patente de EE. UU. n.º 7,541,440), Ab124 y Ab125 (anti-CXCR4, patente de EE. UU. n.º 7,138,496).

Otros anticuerpos que pueden proporcionar regiones de unión para su uso en combinación con una cadena J modificada que aumente la semivida de una molécula de unión al sujeto incluyen, por ejemplo, abciximab (anti-glicoproteína 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 (receptor anti-PD-1), nivolumab (receptor anti-PD-1), ipilimumab (anti-CTLA-4), abagovomab (anti-CA-125), adegatumumab (anti-EpCAM), atlizumab (receptor anti-IL-6), benralizumab (anti-CD125), obinutuzumab (GA101, anti-CD20), CC49 (anti-TAG-72), AB-PG1-XG1-026 (anti-PSMA, solicitud de patente de EE. UU. n.º de serie 11/983,372, depositada como ATCC PTA-4405 y PTA-4406), D2/B (anti-PSMA, documento WO 2009/130575), tocilizumab (receptor anti-IL-6), basiliximab (anti-CD25), daclizumab (anti-CD25), efalizumab (anti-CD11a), GA101 (anti-CD20; Glycart Roche), atalizumab (integrina anti- α .4), omalizumab (anti-IgE), anticuerpos anti-TNF- α , tales como CDP571 (Ofei et al., 2011, Diabetes 45:881-85), MTNFAI, M2TNFAI, M3TNFAI, M3TNFABI, M302B, M303 (Thermo Scientific, Rockford, Ill.), infliximab (Centocor, Malvern, Pa.), certolizumab pegol (UCB, Bruselas, Bélgica), anti-CD40L (UCB, Bruselas, Bélgica), adalimumab (Abbott, Abbott Park, Ill.), BENLYSTA.RTM. (Human Genome Sciences); anticuerpos para terapia de la enfermedad de Alzheimer tales como Alz 50 (Ksiezak-Reding et al., 1987, J Biol Chem 263:7943-47), gantenerumab, solanezumab e infliximab; anticuerpos anti-fibrina similares a 59D8, T2G1s, MH1; anticuerpos anti-CD38 tales como MOR03087 (MorphoSys AG), MOR202 (Celgene), HuMax-CD38 (Genmab) o daratumumab (Johnson & Johnson); trastuzumab (anti-HER2); tremelimumab (anti-CTLA4); urelumab (anti-CD137 (4-1BB)); vorsetuzumab (anti-CD70); duligotumab (anti-HER3); dacetuzumab (anti-CD40); varilumab (anti-CD27); atezolizumab (anti-PD-L1); anticuerpos anti-MAGEI tales como MA454 (Thermo Scientific, Rockford, IL); anticuerpos anti-OX-40 tales como ACT35 (Affymetrix eBioscience, San Diego, CA); anticuerpos anti-GITR tales como 621 (BioLegend, San Diego, CA); anticuerpos anti-HVEM tales como 122 (BioLegend, San Diego, CA); anticuerpos anti-TIM3 tales como F38-2E2 (BioLegend, San Diego, CA); anticuerpos anti-LAG3 tales como 3DS223H (Affymetrix eBioscience, San Diego, CA); anticuerpos anti-BTLA tales como MIH26 (BioLegend, San Diego, CA); anticuerpos anti-VISTA antibodies tales como MAB71261 (R&D Systems, Mineápolis, MN); anticuerpos anti-TIGIT tales como MBSA43 (Affymetrix eBioscience, San Diego, CA); anticuerpos anti-CEACAM tales como D14HD11 (abcam, Cambridge, MA); anticuerpos anti-Gp100 tales como ab52058 (abcam, Cambridge, MA); anticuerpos anti-NY-ESO-1 tales como E978 (Thermo Scientific,

Rockford, IL); anticuerpos de antígeno anti-Sialyl Lewis X tales como MAB2096 (EMD Millipore, Billerica, MA); anticuerpos de antígeno anti-Tn tales como MAI-90544 (Thermo Scientific, Rockford, IL); anticuerpos anti-VIH tales como P4/D10 (patente de EE. UU. n.º 8,333,971), Ab 75, Ab 76, Ab 77 (Paulik et al., 1999, *Biochem Pharmacol* 58:1781-90), así como los anticuerpos anti-VIH descritos en la patente de EE. UU. n.º 5,831,034, patente de EE. UU. n.º 5,911,989, y Vcelar et al., *AIDS* 2007; 21(16):2161-2170 y Joos et al., *Antimicrob. Agentes Chemother.* 2006; 50(5):1773-9; anticuerpos anti-albúmina tales como ab 106582 (abcam, Cambridge, MA); anticuerpos anti-FcRn tales como sc-271745 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticuerpos anti-receptor de transferrina tales como ab61021 (abcam, Cambridge, MA); anticuerpos anti-receptor de insulina tales como ab5500 (abcam, Cambridge, MA); anticuerpos anti-receptor de IGF-1 tales como ab5681 (abcam, Cambridge, MA); anticuerpos anti-receptor de leptina tales como ab5593 (abcam, Cambridge, MA); anticuerpos anti-TNF alfa tales como ab31908 (abcam, Cambridge, MA); anticuerpos anti-beta amiloide tales como ab2539 (abcam, Cambridge, MA); anticuerpos anti-ácido hialurónico como ab53842 (abcam, Cambridge, MA); anticuerpos anti-BACE como ab2077 (abcam, Cambridge, MA); anticuerpos anti-TSG-6 como ab204049 (abcam, Cambridge, MA).

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende albúmina sérica humana. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un péptido de unión a albúmina sérica humana. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a albúmina sérica humana. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a albúmina sérica humana.

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a FcRn. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un péptido de unión a FcRn. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un dominio Fc.

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende transferrina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a transferrina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a transferrina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión al receptor de transferrina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión al receptor de transferrina.

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión al receptor de transferrina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a insulina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a insulina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión al receptor de insulina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización

inhibidora de células T mediada por PD-1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión al receptor de insulina.

- [illegible]

leptina.

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende IGF-1. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a IGF-1. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a IGF-1. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión al receptor de IGF-1. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión al receptor de IGF-1.

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende basigina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a basigina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a basigina.

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende Glut1. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a Glut1. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a Glut1.

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende CD98hc. In one specific embodiment, a binding molecule whose IgM, IgA, IgG/IgM, or IgG/IgA antibody binds to PD-L1 and antagonizes a PD-L1-mediated T-cell inhibitory signaling pathway has an ADME-modulating moiety on the J-chain that comprises a CD98hc-binding antibody moiety. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a PD-L1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-L1 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a CD98hc.

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a TIM3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIM3 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende albúmina sérica humana. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a TIM3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIM3 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un péptido de unión a albúmina sérica humana. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a TIM3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIM3 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a albúmina sérica humana. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a TIM3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIM3 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a albúmina sérica humana.

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a TIM3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIM3 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a FcRn. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a TIM3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIM3 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que

5
10

15
20

25
30

35
40

45

50

55

60

65

o IgG/IgA se une a CD40 y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por CD40 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a basigina.

- 5 En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a CD40 y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por CD40 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende Glut1. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a CD40 y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por CD40 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a Glut1. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a CD40 y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por CD40 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a Glut1.

- 10 En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a CD40 y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por CD40 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a CD98hc. In one specific embodiment, a binding molecule whose IgM, IgA, IgG/IgM, or IgG/IgA antibody binds to CD40 and agonizes a CD40-mediated T-cell inhibitory signaling pathway has an ADME-modulating moiety on the J-chain that comprises a CD98hc-binding antibody moiety. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a CD40 y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por CD40 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a CD98hc.

- 15 En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende albúmina sérica humana. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un péptido de unión a albúmina sérica humana. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a albúmina sérica humana. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a albúmina sérica humana.

- 20 En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a FcRn. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un péptido de unión a FcRn. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un dominio Fc.

- 25 En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende transferrina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a transferrina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a transferrina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión al receptor de transferrina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión al receptor de transferrina.

- 30 En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende insulina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a GTR y agoniza una vía de señalización inhibitoria de células T mediada por GTR tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a insulina. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o

- [illegible]

BACE tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende CD98hc. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a BACE tiene un resto modulador de ADME en la cadena J que comprende un resto de anticuerpo de unión a CD98hc. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a BACE

5 tiene un resto que modula el ADME en la cadena J que comprende un fragmento de anticuerpo scFv de unión a CD98hc.

Se debe entender que un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que se une a cualquiera de las dianas enumerados en este documento se puede combinar con una cadena J modificada con cualquiera de los restos que modulan el ADME enumeradas en este documento para crear una molécula de unión. Por lo tanto, cualquier diana de anticuerpo enumerado en este documento se puede combinar con cualquier resto que modula el ADME enumerada en este documento. La FIG. 13 proporciona una lista de ejemplos no limitantes de dianas de anticuerpos y restos que modulan el ADME que pueden incluirse en una cadena J de una molécula de unión de acuerdo con aspectos de la invención. Cualquiera de las dianas de anticuerpos enumerados en la

10 columna izquierda de la FIG. 13 se pueden combinar con cualquiera de los restos que modulan el ADME enumeradas en la columna derecha de la FIG. 13.

Si bien en este documento se hace referencia específicamente a ciertas realizaciones preferidas, se debe entender que los anticuerpos IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA con especificidad de unión a cualquier diana, tal como cualquier antígeno tumoral, que comprende una cadena J modificada con cualquier resto que modula el

20 ADME descrita en este documento se contemplan y están dentro del alcance de la presente invención.

En una realización preferida, el anticuerpo multiespecífico IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a uno o más de las dianas tumorales enumerados en este documento, mientras que la cadena J comprende un resto que modula el ADME.

25

En otra realización preferida, la cadena J de las moléculas de unión en un sujeto incluye un resto que modula el ADME que es un scFv, y que reduce el aclaramiento de la molécula de unión al unirse a la albúmina. En una realización preferida, el resto que modula el ADME en la cadena J es un scFv que se une a la albúmina.

30

En una realización preferida, una molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une a CD20, y el resto que modula el ADME en la cadena J es albúmina sérica humana (HSA). En otra realización preferida, una molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une a CD20, y el resto que modula el ADME en la cadena J es un scFv anti-albúmina.

35

En una realización preferida, una molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une a DR5, y el resto que modula el ADME en la cadena J es albúmina sérica humana (HSA). En otra realización preferida, una molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une a DR5, y el resto que modula el ADME en la cadena J es un scFv anti-albúmina.

40

En una realización preferida, una molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une a BACE, y el resto que modula el ADME en la cadena J es transferrina. En otra realización preferida, una molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une a BACE, y el resto que modula el ADME en la cadena J es un scFv anti-receptor de transferrina. En otra realización preferida, una molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une a BACE, y el resto que modula el ADME en la cadena J es un scFv anti-transferrina.

45

En una realización preferida, una molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une a VEGF, y el resto que modula el ADME en la cadena J es la proteína de unión al ácido hialurónico (HABP). En otra realización preferida, la molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une al VEGF, y el resto que modula el ADME en la cadena J es un scFv antiácido hialurónico.

50

En una realización preferida, la molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une al TNF alfa, y el resto que modula el ADME en la cadena J es la proteína de unión al ácido hialurónico (HABP). En otra realización preferida, la molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une al TNF alfa, y el resto que modula el ADME en la cadena J es un scFv antiácido hialurónico.

55

En todas las realizaciones, un resto que modula el ADME de la cadena J modificada puede introducirse antes o después de la cadena J. Así, una cadena J modificada con un resto que modula el ADME de scFv anti-albúmina que aumenta la retención de la molécula de unión en la circulación mediante la unión a la albúmina puede tener una configuración de scFv-J anti-albúmina o de scFv J-anti-albúmina. Una ilustración esquemática de dos ejemplos no limitantes de tales configuraciones se proporcionan en las FIGS. 4A y 4B.

60

Debido a su mayor avidéz, las moléculas de unión en un sujeto son superiores respecto a los anticuerpos de IgG biespecíficos. Por ejemplo, como resultado, son adecuados para dirigirse a dianas de expresión de bajo nivel, tal como las células de linfoma de Burkitt resistente al Rituxan caracterizadas por un bajo nivel de expresión de CD20. Además, los anticuerpos de IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA que comprenden en esta invención

65

una cadena J modificada han aumentado de gran manera la potencia relativa a los anticuerpos de IgG biespecíficos.

Composiciones farmacéuticas de anticuerpos con cadena J modificada

5 Para usos terapéuticos, las moléculas de unión al sujeto 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 apreciarán los expertos en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de la enfermedad o afección diana y de los resultados deseados. Para 10 administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir o administrar conjuntamente el compuesto con material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un vehículo adecuado, por ejemplo, liposomas, o en 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 15 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.

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

25 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar para obtener una cantidad de ingrediente activo efectiva para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores 30 farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el momento de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplee, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales que se utilicen en combinación con los compuestos particulares empleados, la edad, el sexo, el peso, el estado general de salud y la historia clínica del paciente que se esté tratando, así como factores similares conocidos en la técnica 35 médica.

La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que pueda administrarse mediante jeringa. Además de agua, el vehículo preferiblemente es una solución salina tamponada isotónica.

40 Los siguientes ejemplos, listado de secuencia y figuras se proporcionan para ayudar el entendimiento de la presente invención, el verdadero alcance del cual se expone en las reivindicaciones adjuntas.

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

45 Ejemplo 1: Las IgM se pueden conjugar con múltiples scFv en cada extremo de la cadena J sin ningún efecto sobre la actividad funcional.

50 La cadena J de una molécula de IgM se puede unir en marco con un scFv diseñado para unirse a una diana de interés en su extremo C- o N- terminal, y las IgM biespecíficas resultantes no se alteran en su estructura o función como lo demuestra la ausencia de disminución en su actividad CDC.

1. Generación de constructos de ADN con mutaciones diseñadas

55 Síntesis de constructo de ADN. Todas los constructos de ADN con mutaciones diseñadas son sintetizadas por proveedores comerciales (Genescript), con sitios de restricción compatibles en ambos extremos para su subclonación en los respectivos vectores de expresión.

60 Constructo de vectores de expresión. Los constructos de ADN sintetizadas se vuelven a suspender en 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 cadena J, Gene 108 (1991) 193-200) mediante técnicas estándar de biología molecular. El ADN ligado se transforma en bacteria competente y se coloca en placas de LB con múltiples antibióticos selectivos. Se eligen varias colonias bacterianas y las preparaciones de ADN se realizan mediante técnicas de biología molecular estándar. El ADN preparado se verifica mediante secuenciación. Solo los clones bacterianos con 100 % de 65 coincidencia de secuencia de ADN con la secuencia de ADN diseñada se utilizan para la preparación de ADN plasmídico y posteriormente para la transfección celular.

Cadena pesada de IgM: Este constructo de cadena pesada tiene una cadena μ de longitud completa para una IgM anti-CD20 que se une a CD20 en la superficie de las células B: Secuencia de cadena pesada de IgM de un anticuerpo anti-CD20:

5 MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV
KQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
YCARSTYYGGDWYFENVWGAGTTVTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLA
QDFLPDSITFSWKYKNNSDISSIRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDV MQGTDEHV
CKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQV
SWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHR
GLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLT TYDSVTISWTR
QNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSEGERFTCTVTHTDLP SPLKQTISR
PKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKY
VTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTV D KSTG
KPTILYNVSLVMSDTAGTCY (SEQ ID: 16)

Este constructo 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 CDIM positivos. Secuencia de la

10 cadena ligera IgM de un anticuerpo anti-CD20:

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW
QQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSN
PPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID NO: 17)

El constructo de cadena ligera tiene un peso molecular de aproximadamente 24kD y cuando se co-expresa con la cadena pesada apropiada (SEQ ID NO: 16) es capaz de unirse a células B CDIM positivas.

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

i. Este constructo está compuesto por un scFv de OKT3 (anti-CD3) fusionado con el N-terminal de la cadena J humana (CD3scFv-15 aa Linker-J, O15J):

20 QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQG LEWIGYINPSRG
YTNYNQKFKDKATLT TDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYS LDYWGQ
GTTLT VSSGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNW
YQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVP AHFRGSGSGTSYSLTISGME AEDAATYYCQQWS
SNPFTFGSGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSQEDERIVLDNKCKCARITSRIIRSSDP
NEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLS DLCKKCDPTEVELDNQIVTATQS
NICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPDGGGSEQKLI
SEEDLNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO: 18)

25 Este constructo tiene un peso molecular de unos 45kD y es capaz de unirse a la cadena ϵ soluble de CD3 (Sino Biological), o a células T; y es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal anti-myc 4A6 u otros anticuerpos anti-myc.

ii. Este constructo está compuesto por un scFv de OKT3 (anti-CD3) fusionado con el C-terminal de la cadena J humana (J-15 aa Linker-CD3scFv, J15O):

QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFV
YHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYG
GETKMOVETALTPDACYPDGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAELARPGASVKMSC
KASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSST
AYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGG
SQIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASG
VPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIKEQKLISEED

5 LNSAVDHHHHHH- (SEQ ID NO: 19)

Este constructo J-CD3scFv tiene un peso molecular de unos 45kD y es capaz de unirse a la cadena épsilon soluble de CD3 (Sino Biological), o a células T_H y es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal anti-myc 4A6 u otros anticuerpos anti-myc.

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

Secuencia de la cadena J para V15J:

MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWV
RQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDYAV
YYCARSAYDYDGFAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLV
DNKCKCARITSRIIRSSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCK
KCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGGETKMOVET
ALTPDACYPD (SEQ ID NO: 20)

20 Secuencia de la cadena J para J15V:

MKNHLLFWGVLAVFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSSEDPNEDIVER
NIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDS
ATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGGETKMOVETALTPDACYPDGGGGSGGGGSGGGG
SQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPR
GYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDYAVYYCARSAYDYDGFAYW
GQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVSYMN
WYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWS
SNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 21)

25 El ADN correspondiente a estas secuencias se sintetizó y transfectó en células HEK293 junto con las cadenas pesadas y ligeras 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 FIG. 6, las cadenas J fusionadas al nuevo scFv anti-CD3 con el enlazador de 15 aa pueden incorporarse a la IgM y la forma pentamérica de la IgM
30 biespecífica con la cadena J correspondiente se distingue claramente de la forma hexamérica sin una cadena J.

2. Expresión, purificación y caracterización de proteínas

a. Transfección. El ADN de cadena J pesada, ligera y modificada se transfecta en células CHO. El ADN para vectores de expresión normalmente se mezcla en una relación 1:1:1 con PEI y a continuación se agrega a las células CHO-S. La transfección de PEI con células CHO-S se realiza de acuerdo con técnicas establecidas. (véase *Biotechnology and Bioengineering*, Vol 87, 553-545).

b. Inmunoprecipitación

i. Capture Select IgM (BAC, Thermo Fisher). Las proteínas de IgM de sobrenadantes de células CHO transfectadas se purifican parcialmente mediante inmunoprecipitación con matriz de afinidad de IgM de Capture Select según el protocolo del fabricante (GE Life Sciences). Después de ser sometida a incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, la matriz de afinidad se separa del sobrenadante mediante centrifugación. La matriz se lava adicionalmente con PBS 3 veces antes de quitar con cuidado el PBS. La proteína capturada se eluye de la matriz al incubar con tampón de proteína de LDS de NuPage (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 matriz de afinidad anti-myc según el protocolo del fabricante. Después de ser sometida a incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, la matriz de afinidad se separa del sobrenadante mediante centrifugación. La matriz se lava adicionalmente con PBS 3 veces antes de quitar con cuidado el PBS después del lavado final. La proteína capturada se eluye de la matriz al incubar con tampón de proteína de LDS de NuPage (Life Technology) durante 5 minutos.

c. Electroforesis en gel

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

ii. SDS-PAGE reductora. Se agregan el amortiguador de muestra de NuPage LDS (Life Technologies) y el agente reductor de NuPage ditiotritol (Life Technologies) a las muestras de proteína de IgM y se calientan a 80 °C durante 10 minutos antes de cargar Gel Bis-Tris 4-12 % en NuPage Novex (Life Technologies). Se utiliza tampón de corrida con NuPage MES SDS (Life Technologies) para la electroforesis en gel. El gel se hace correr hasta que el frente del tinte alcance la parte inferior del gel. Después de que la electroforesis se haya completado, quitar el gel del aparato y teñir el gel utilizando tinción de azul coloidal (Life Technologies).

iii. El ADN correspondiente a estas cadenas pesadas y ligeras, así como el correspondiente a las secuencias de cadena J de tipo salvaje (wt), O15J o 1150 descritas anteriormente, se cotransfectaron en células HEK293 y las proteínas se expresaron y purificaron utilizando la resina de camélido como se describió anteriormente. Como se muestra en la FIG. 6, las cuatro proteínas expresan bien. El hexámero IgM anti-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 unido a la cadena J en cualquier orientación (O15J o 1150).

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

La citotoxicidad dependiente del complemento es un mecanismo clave para la muerte celular por anticuerpos. Los anticuerpos de IgM son conocidos por tener destrucción celular dependiente del complemento (CDC) aumentada debido a su forma multimérica. Un aspecto clave de esta invención fue probar si la incorporación de cadenas J modificadas, que llevan scFv o enlazadores Vhh de camélidos de células efectoras en sus extremos C o N, causa interferencia con la unión de C1q, el componente clave de la vía del complemento, y por lo tanto puede inhibir la CDC. Se midió la actividad CDC de cada una de los constructos IgM e IgM biespecífica. Como se muestra en la FIG. 7, la incorporación de la cadena J modificada no tiene, inesperadamente, ningún efecto perjudicial sobre la actividad CDC de las IgM biespecíficas. Además, con las longitudes de enlace probadas, se encontró que las IgM biespecíficas tienen una actividad CDC entre 60-100 veces mejorada con respecto a la IgG correspondiente en términos molares (FIG. 7).

Ejemplo 2: Las IgM biespecíficas pueden unirse a dos dianas simultáneamente y mostrar efectos funcionales

El ADN correspondiente a estas cadenas pesadas y ligeras, así como el correspondiente a las secuencias de cadena J de tipo salvaje (wt) (FIG. 3), cadena V15J o J15V que se muestran arriba, se cotransfectaron en

células HEK293 y las proteínas se expresaron y purificaron utilizando la resina de camélido como se describió anteriormente. Como se muestra en la FIG. 6, las cuatro proteínas expresan bien. El hexámero IgM anti-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 unido a la cadena J en cualquier orientación.

Las proteínas purificadas se analizaron para la activación de las células T usando un kit basado en el gen indicador de luciferasa disponible comercialmente (Promega). Brevemente, se añadió proteína purificada a 7500 Ramos y 25.000 células Jurkat genomanipuladas (Promega CS176403) en 40 µl de RPMI con SFB al 10 %. La mezcla se incubó durante 5 h a 37 °C con 5 % de CO₂. Las células se mezclaron con tampón de lisis que contenía luciferina para medir la actividad indicadora de luciferasa. La salida de luz se midió con el lector de placas EnVision y se analizó mediante el software Prism. Como se muestra en la FIG. 8, solo los anticuerpos que llevan la porción de unión scFv específica de CD3 en la cadena J pueden mostrar activación dependiente de la dosis, mientras que el anticuerpo IgM que carece de la cadena J modificada o el IgG no pueden mostrar ninguna señal en este ensayo.

Ejemplo 3: Constructo y prueba de un anticuerpo anti-CD20 con un dominio de unión a albúmina unido a la cadena J

Se estima que la vida media de las IgM en el plasma humano es de alrededor de 2-3 días y aún más corta en ratones (FIG. 9). Esto es significativamente más corto que para las IgG, que interactúan con el receptor Fc neonatal (FcRn) y se reciclan después de la endocitosis, lo que permite una vida media mucho más larga de aproximadamente 21 días. Para aumentar la vida media de las IgM, se realizó la unión de scFv a cualquiera de los extremos de la cadena J, sin alterar significativamente las funciones efectoras de las IgM, como CDC (FIG. 7).

Hay varias estrategias que se han descrito en la técnica para permitir la extensión de la vida media de los productos biológicos. Estos incluyen la unión de mutantes de albúmina de suero humano (Andersen et al, JBC VOL. 289, NO. 19, págs. 13492-13502, 2014), péptidos (Dennis et al, J. Biol. Chem. 2002, 277:35035-35043) o scFv que pueden unirse a la albúmina de suero humano (Muller et al mAbs 4:6, 673-685; 2012),

A continuación se muestra la secuencia de un ejemplo de cadena J que se puede utilizar para extender la vida media de las IgM utilizando un dominio de unión a albúmina diseñado para unirse a la albúmina sérica humana con alta afinidad (Hopp et al PEDS 23:pp 827-833 (2010)).

Dominio de unión de albúmina:
QHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP (SEQ ID NO: 22)

Cadena J wt:

QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFV
YHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYG
GETKMVETALTPDACYPD (SEQ ID NO: 1)

A15J:

QHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP
GGGGSGGGSGGGGSQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLN
NRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTY
DRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD (SEQ ID NO: 23)

La expresión y el ensamblaje de esta fusión ABD-cadena J en IgM se probaron utilizando la secuencia IgM descrita en el Ejemplo 1. Además, se verificó que la fusión de este ABD a la cadena J no perturbaba la actividad CDC en IgM anti-CD20 en líneas celulares diana que portaban CD20 en su superficie (por ejemplo, Ramos) como se describe en el Ejemplo 1. Finalmente, se midió la afinidad de ABD en el contexto de la IgM, para la unión a HSA utilizando HSA inmovilizada mediante resonancia plasmónica de superficie (Biacore).

Ejemplo 4: Constructo y prueba de un anticuerpo anti-CD20 con scFv de unión a transferrina

La administración de fármacos biológicos a dianas en el sistema nervioso central, particularmente el cerebro, es un problema desafiante debido a la barrera hematoencefálica (BHE). El receptor de transferrina (TfR) está sobreexpresado en el endotelio de la BHE. Se cree que actúa como una lanzadera para transportar nutrientes

tal como el hierro desde la periferia hasta el cerebro. Varios grupos han utilizado la transcitosis mediada por receptores (RMT) para administrar productos biológicos al cerebro. Por ejemplo, Jones et al. han descrito el uso de anticuerpos que se unen a la transferrina como un método para transportar productos biológicos a través de la BHE (Jones, A.R y E.V. Shusta. 2007. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. Pharm. Res. 24:1759-1771).

Se utilizó una de estas secuencias de unión de transferrina (secuencia Vh seleccionada de la visualización de fagos por Yang et al) para realizar una fusión en marco con nuestra cadena J como se muestra a continuación.

10 Secuencia Vh de unión al receptor de transferrina:

MAQVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAAS GGFIFNTEY MAWVRQ
APGKGLEWVSAIKEQSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL
Q MNSLR AEDTAVYYCA AQM HHEAEVKFWGQGT LVTVS (SEQ
ID NO: 24)

Secuencia Vh de unión al receptor de transferrina fusionada a la cadena J en el extremo N-terminal:

15

MAQVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAAS GGFIFNTEY MAWVRQ
APGKGLEWVSAIKEQSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL
Q MNSLR AEDTAVYYCA AQM HHEAEVKFWGQGT L
VTVS GGGGSGGGGSGGGGSQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSS EDPNEDIVERNIRII
VPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATET
CYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETK MVETALTPDACYPD (SEQ ID NO: 25)

La cadena J de fusión se incorporó a una IgM relevante (por ejemplo, la IgM CD20 descrita anteriormente). Además de los ensayos descritos anteriormente para la expresión y el ensamblaje, se llevaron a cabo ensayos de unión de antígeno, unión celular e internalización celular para verificar que la cadena J de IgM+TfR resultante sea funcional.

La unión del antígeno se probó utilizando ELISA con receptor de transferina humana recombinante disponible comercialmente (R&D Systems) inmovilizado en placas. Brevemente, se agregaron ~100 ng de receptor de transferrina humano a una placa de 96 pocillos (placa Nunc Maxisorb) por pocillo a 4 °C durante la noche. La placa se lavó con PBS-0,05% Tween-20 tres veces y se bloqueó con StartingBlock (Pierce) a 37 °C durante 1 hora. Luego, la placa se lavó con PBST tres veces después de retirar la solución de bloqueo. Se añadieron los anticuerpos biespecíficos con diferentes concentraciones a cada pocillo y la placa se dejó reposar a 37 °C durante 1 hora. Después de tres lavados con PBST, se añadió anticuerpo anti-IgG Fc humano conjugado con HRP (Abcam, diluido en StartingBlock en una proporción de 1:10 000) a cada pocillo y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de tres lavados con PBST, se añadió sustrato colorimétrico TMB (US Biological) a cada pocillo para realizar una reacción de peroxidasa. Después de la adición de la solución de detención (H2SO4 1 M), se monitoreó la absorbancia a 450 nm y se calculó la constante de equilibrio (K_D) para el anticuerpo ajustando los datos resultantes con Graph Pad Prism. Para probar la unión de CD20, se utilizó un ELISA utilizando CD20-Fc inmovilizado (Acros Biosystems) como se ilustra en la FIG. 10. El anticuerpo de detección para este ELISA es un anticuerpo de cadena ligera kappa humana de ratón conjugado con HRP (Southern Biotech, 9230-05). La captura, detección y desarrollo se llevan a cabo como se detalla anteriormente.

Para verificar que la IgM resultante se une a las células diana se utiliza un ensayo basado en FACS como los descritos en el Ejemplo 1, en líneas de células tumorales que se sabe que sobreexpresan el receptor de transferrina, por ejemplo, la línea celular de eritroleucemia humana K562. Las lecturas de intensidad de fluorescencia media se analizaron utilizando GraphPad Prism para calcular una K_d .

Ejemplo 5: Uso de etiquetado quimioenzimático específico del sitio para generar agentes de imágenes y conjugados de anticuerpos y fármacos con IgM

Las IgM son biomoléculas muy grandes (>1 MDa con cadena J). El etiquetado de IgM para permitir su visualización en estudios con animales es problemático debido a los numerosos residuos de lisina libres. Para permitir el etiquetado con estequiometría y posiciones que retengan la actividad de las IgM, se lleva a cabo un etiquetado específico del sitio utilizando enfoques quimioenzimáticos como se revisó en Kline et al (Pharm Res 2014 Dec 16).

Un método para etiquetar específicamente el sitio de las moléculas de IgM es utilizar una estrategia de etiquetado de glicanos como se describe en Houghton et al (PNAS (52) 15850-15855). El método utiliza una combinación de enzimas: beta galactosidasa para eliminar un residuo terminal de galactosa y luego una galactosa transferasa promiscua (GalTY289L) para instalar un azúcar etiquetado con azida (GlcNAz) que puede usarse para agregar postsintéticamente un colorante o citotoxina etiquetado con DIBO. Debido a que la cadena pesada de IgM lleva cinco glicanos en lugar del único glicano en cada cadena pesada de un anticuerpo IgG, se espera un etiquetado mucho más eficiente utilizando este enfoque con una relación anticuerpo-colorante/fármaco de hasta 1:102 si el glicano en la cadena J también está derivatizado. Como se muestra en la FIG. 10, utilizando un ejemplo de IgM (1.5.3V15J15HSA), se demostró un etiquetado eficiente con este enfoque y un colorante DIBO Alexa 647. Claramente, también se puede utilizar un enfoque similar para generar IgM etiquetadas con trazadores PET y moléculas citotóxicas.

Como segundo ejemplo de uso de una secuencia aceptora en la cadena J para el etiquetado específico del sitio postraducciona, el sitio de reconocimiento "LLQGA" de la transglutaminasa microbiana (mTGasa) se agrega al extremo C-terminal de la cadena J como se muestra a continuación (FIG. 12).

Cadena J con "etiqueta Q":

QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFV

YHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYG

GETKMOVETALTPDACYPDGGGGSGGGSGGGGSLQGA (SEQ ID NO: 26)

A continuación, las moléculas de colorante con una amina primaria en su extremo terminal, por ejemplo, Alexa 488 Cadaverine (Thermo Scientific), se hicieron reaccionar con IgM que incorporaban esta cadena J en presencia de mTGase en condiciones estándar (Strop et al Bioconjugate Chemistry 2015 26(4) 650-9). Después de la incubación durante la noche a temperatura ambiente con un exceso molar de colorante de 5X, el colorante libre se separó de la IgM etiquetada mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna NAP-5 (Biorad). La incorporación de colorante se cuantificó utilizando la absorbancia a 488 nm.

De ello se deduce que dichos métodos también se pueden utilizar con otras enzimas que se pueden utilizar para la modificación quimioenzimática, así como con otras moléculas pequeñas (por ejemplo, fármacos citotóxicos) que llevan asas apropiadas para la funcionalización.

Ejemplo 6: Estudios de biodistribución in vivo utilizando IgM etiquetadas con el colorante infrarrojo cercano VivoTag680 (Perkin Elmer)

Para seguir la biodistribución de IGM-55.5 en ratones, la molécula se marcó con un colorante infrarrojo cercano VivoTag680 (Perkin Elmer) utilizando acoplamiento de amina estándar con un éster NHS a pH neutro (Vasquez et al, PLoS One. 2011; 6: e20594). El grupo inyectado recibió una inyección intravenosa con 2 nmol/ratón de la molécula IgM etiquetada. El grupo de control de fondo permaneció sin inyectar como una forma de distinguir la señal de fluorescencia de los anticuerpos etiquetados de la señal de fondo de bajo nivel, que proviene principalmente de los alimentos en el intestino. El punto de tiempo de obtención de imágenes t0 se realizó inmediatamente después de la inyección del anticuerpo. Los ratones fueron sacrificados después del punto final de obtención de imágenes in vivo, seguido de la resección de tejidos y la obtención de imágenes ex vivo.

En la FIG. 11 Panel A se presenta un esquema generalizado de un modelo de biodistribución temporal evaluado mediante FMT 3D in vivo. Este tipo de estudio es muy adecuado para determinar de forma no invasiva tanto la farmacocinética sanguínea de los anticuerpos etiquetados (determinada a partir de la disminución de la señal de fluorescencia de la sangre en el corazón), como también la biodistribución cinética en varios sistemas orgánicos (cerebro, pulmones, corazón, hígado, riñones, estómago, intestinos, vejiga y piel). Para cada animal, en cada punto de tiempo, la señal de fluorescencia sanguínea se restó de la señal total de cada uno de los otros órganos para proporcionar una determinación más precisa de la acumulación de tejido. Los tejidos in vivo también se evaluaron ex vivo en el punto temporal terminal mediante epifluorescencia. También se obtuvieron mediciones de epifluorescencia ex vivo para la vesícula biliar, el músculo, el bazo, el páncreas, los glóbulos blancos, los ganglios linfáticos y los intestinos (que se lavaron antes de la obtención de imágenes para eliminar el material fecal).

Se realizaron imágenes de biodistribución de todo el cuerpo y la cabeza en el FMT4000 a las 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48 y 96 horas después de la inyección. Se extrajeron muestras de sangre de otros animales a las 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48 y 96 h, y estas muestras de sangre se enviaron a IGM Biosciences para su análisis. Para la obtención de imágenes tomográficas, los animales se colocaron en posición supina dentro de un casete de imágenes que proporcionaba una sujeción suave y una compresión leve. Todas las imágenes se adquirieron con éxito en los momentos planificados. La biodistribución no invasiva en todo el cuerpo y la farmacocinética sanguínea

mostraron un rápido aclaramiento sanguíneo ($t_{1/2} = 20$ minutos) y una acumulación dominante en el hígado con cierta señal en el estómago y los riñones. Los controles no inyectados mostraron solo una señal de bajo nivel dentro del estómago y los intestinos, y los datos de los ratones inyectados con IgM se corrigieron para estos niveles de fondo. La acumulación en el hígado, los riñones y el estómago fue muy rápida y alcanzó los niveles más altos 1 hora después de la inyección, desapareciendo parcialmente a las 96 horas. La mayor parte de la señal residía en el hígado (aproximadamente 5 veces la de los otros tejidos); pero al normalizar según el peso del tejido, se pudo observar una intensidad de señal comparable en el estómago, con una intensidad de señal algo menor en los riñones (FIG. 11, Panel B). Dichos estudios in vivo también pueden llevarse a cabo con IgM que llevan cadenas J modificadas para evaluar el aumento de la vida media o la distribución tisular.

Ejemplo 7: Farmacocinética de IgG vs. IgM con cadena J

Se realizaron estudios farmacocinéticos (PK) en ratones Balb/c para evaluar la eliminación de anticuerpos IgG e IgM, con y sin una cadena J modificada adjunta. Se administraron 100 μ g de cada anticuerpo a los ratones mediante infusión intravenosa. Se recogieron aproximadamente 500 μ L de sangre mediante punción cardíaca terminal en cada punto temporal, con 3 ratones por punto temporal y 8 o 15 puntos temporales en total. Se utilizó ELISA para medir la concentración de cada anticuerpo en la sangre. Se verificaron las métricas de calidad en todos los ELISA y los parámetros farmacocinéticos se derivaron utilizando técnicas de ajuste de curva estándar.

Los resultados farmacocinéticos de Rituximab, IgM policlonal e IgM 55.5 se proporcionan en la FIG. 16. Estos resultados demuestran que la vida media de la IgM en ratones es significativamente más corta que la de la IgG, como lo demuestra el hecho de que el Rituximab (IgG) tuvo una vida media más larga que la de la IgM policlonal o la IgM 55.5. Además, la vida media de la IgM 55.5, producida en células CHO, fue más corta que la de la IgM policlonal humana.

Los resultados de IgM 1.5.3 con y sin cadena J se proporcionan en la FIG. 17. Como se muestra, la vida media de IgM 1.5.3 sin cadena J (1.5.3 IgM) fue comparable a la vida media de IgM 55.5. La adición de una cadena J de tipo salvaje redujo la vida media de IgM 1.5.3. La adición de una cadena J con la orientación V-enlazador-J (1.5.3. V15J) redujo aún más la vida media del anticuerpo. Estos resultados demuestran que la adición de la cadena J a un anticuerpo IgM reduce la vida media del anticuerpo.

Ejemplo 8: La fusión de un dominio de unión de albúmina a la cadena J reduce significativamente el aclaramiento de IgM

Como se señaló anteriormente, la farmacocinética de las IgM indica un rápido aclaramiento sanguíneo. Se realizaron experimentos para determinar los efectos de prolongación de la vida media sérica al unir un dominio de unión de albúmina (ABD) (SEQ ID NO: 22) a una cadena J de IgM. El ADN correspondiente a las cadenas pesadas y ligeras de IgM como se muestra en el Ejemplo 1, así como el correspondiente a la secuencia V15J del Ejemplo 1 (Visilizumab (V) fusionado a la cadena J a través de un enlazador que contiene 15 residuos de aminoácidos) o la secuencia A15J del Ejemplo 3 (un dominio de unión a albúmina fusionado a la cadena J a través de un enlazador que contiene 15 residuos de aminoácidos) se cotransfectaron en células HEK293, y las proteínas se expresaron y purificaron utilizando la resina de camérido como se describió anteriormente. Tres grupos de ratones recibieron una inyección intravenosa con 100 μ g/ratón de V15J-1.5.3-IgM, A15J-1.5.3-IgM o Rituximab (IgG). Se tomaron muestras de sangre periódicamente después de la inyección inicial y se midió la concentración sérica de cada anticuerpo inyectado en las muestras utilizando un ELISA adaptado para medir la concentración de los anticuerpos probados en suero.

Los datos demuestran que la fusión de un dominio de unión de albúmina a la cadena J resultó en un aumento significativo y relativamente grande en la vida media de las IgM. Como se muestra en la FIG. 18, la vida media beta de V15J-1.5.3-IgM, que no incluía el dominio de unión de albúmina, fue de solo 7 horas. Por el contrario, la vida media beta de A15J-1.5.3-IgM, que incluía el dominio de unión a la albúmina en la cadena J, fue de 32 horas, lo que fue comparable al de Rituximab.

Ejemplo 9: Ensamblaje y expresión de la cadena J de albúmina IgM

Se prepararon constructos de cadena J que incorporan una albúmina sérica humana (HSA) como se proporciona en el Ejemplo 1. los constructos se prepararon con la HSA posicionada en el extremo N-terminal de la cadena J (HSA-15-J) y en el extremo C-terminal de la cadena J (J-15-HSA). Para verificar que los anticuerpos IgM que incorporan cadenas J que contienen HSA en cualquiera de estas configuraciones se podían ensamblar y expresar, se realizaron geles SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y transferencias Western.

Reducción de SDS-PAGE: el tampón de muestra NuPage LDS (Life Technologies) y el agente reductor ditiotreitól de NuPage (Life Technologies) se agregaron a las muestras de proteína IgM y se calentaron a 80 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Gel (Life Technologies). Se usó

tampón de migración de MES SDS NuPage (Life Technologies) para la electroforesis en gel. Los geles migraron hasta que el frente del tinte alcanzó la parte inferior del gel. Después de que completarse la electroforesis, se retiró el gel del aparato y se tiñó usando tinción de azul coloidal (Life Technologies).

- 5 Transferencia Western: Un gel de acrilamida corrido en las condiciones descritas anteriormente se lavó en una solución de etanol al 20% durante 10 minutos y luego la proteína se transfirió a una membrana PVDF iBlot (Invitrogen) utilizando el sistema iBlot Dry Blotting System (Invitrogen) a 20 V durante 10 minutos. Después de la transferencia, la membrana de PVDF se bloqueó usando seroalbúmina bovina al 2 %, Tween 20 al 0,05 % durante al menos 12 horas. Se añadió una dilución 1/500 de cadena J de anticuerpo de Pierce (ThermoFisher) a la membrana, se incubó durante 1 hora y, a continuación, se añadió una dilución 1/5000 de IgG anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) y se dejó incubar a oscuras durante 30 minutos. Finalmente, se añadió el sustrato quimioluminiscente Super Signal West Pico (ThermoFisher) a la membrana y la señal resultante se visualizó usando el sistema de imágenes ChemiDoc-It HR410 (UVP) o exponiendo la membrana a una película radiográfica.

- 15 Los resultados se proporcionan en la FIG. 19 y demuestran que las cadenas J que tienen cualquiera de estas configuraciones se pueden incorporar con éxito en anticuerpos IgM, y que los anticuerpos IgM resultantes se pueden ensamblar y expresar por células CHO.

20 Ejemplo 10: Actividad CDC de cadenas J que contienen ABD/HSA

- Se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) utilizando anticuerpos IgM que incorporaban una cadena J que tenía la configuración HSA-15-J (HSA en el extremo N-terminal de la cadena J, seguida de una secuencia de enlace de 15 aminoácidos) o J-15-HSA (HSA en el extremo C-terminal de la cadena J, precedida por una secuencia de enlace de 15 aminoácidos).

- Ramos, se cultivó una línea celular CD20+ en placas blancas de media área de 96 pocillos a 25.000 células/pozo. La proteína en evaluación y el complemento humano (5% final, Quidel) se agregaron para iniciar el análisis de CDC 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 de Envision (Perkin Elmer) utilizando 0,1 s de tiempo de integración por pocillo. El porcentaje de células viables se calculó normalizando los valores de luminiscencia (unidades de luminiscencia relativa - RLU) frente a los pocillos sin compuesto de prueba añadido. Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism y un ajuste de cuatro parámetros con valores superiores e inferiores fijados en 100 y 0 % de viabilidad respectivamente.

- 35 Los resultados se proporcionan en la FIG. 20. Los resultados demuestran que los anticuerpos de cadena J IgM+HSA ensamblados son funcionalmente activos en los ensayos CDC en ambas orientaciones.

40 Ejemplo 11: Farmacocinética de los constructos J-HSA y HSA-J

- Se realizaron estudios PK, como se describió anteriormente, en ratones para evaluar las características PK de los anticuerpos IgM que incorporan una cadena J que tiene la orientación HSA-15-J o J-15-HSA. Los resultados se proporcionan en la FIG. 21 y FIG. 22. Los resultados demuestran un efecto de orientación, en donde la HSA ubicada en el extremo N-terminal (orientación HSA-15-J) tuvo una vida media disminuida en comparación con la orientación J-15-HSA (HSA ubicada en el extremo C-terminal).

Ejemplo 12: Ensamblaje y expresión de constructos de cadena J "bidentados"

- Se llevaron a cabo estudios de ensamblaje y expresión como se describió anteriormente en el Ejemplo 9 para constructos que contenían tanto un resto de unión a CD3 (abreviada como "V") como un resto de extensión de la vida media (ya sea una proteína de dominio de unión a albúmina, abreviada como "ABD", o una proteína de albúmina sérica humana, abreviada como "HSA"). Estas constructos se denominan constructos "bidentados". A continuación, en la Tabla 10, se presenta un resumen de todos los constructos evaluados.

- 55 Se prepararon constructos con el resto que extiende la vida media (por ejemplo, "ABD" o "HSA") ubicada en el extremo C de la cadena J, y el resto que se une a CD3 (por ejemplo, "V") ubicada en el extremo N-terminal. Para verificar que los anticuerpos IgM que incorporan cadenas J con cualquiera de estas configuraciones podían ensamblarse y expresarse, se realizaron geles SDS-PAGE en condiciones reductoras y transferencias Western, como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la FIG. 23, y demuestran que las cadenas J con cualquiera de estas configuraciones pueden incorporarse con éxito a moléculas IgM, y que las moléculas IgM resultantes pueden ensamblarse y expresarse mediante células CHO.

Ejemplo 13: Actividad CDC de constructos de cadena J bidentados

- 65 Los ensayos CDC, como se describió anteriormente en el Ejemplo 10, se llevaron a cabo utilizando anticuerpos IgM que incorporaban las cadenas J bidentadas descritas anteriormente en el Ejemplo 12. Los resultados se

proporcionan en la FIG. 24 y en la FIG. 25. Los resultados demuestran que las cadenas J bidentadas que se evaluaron no disminuyeron la actividad CDC de los anticuerpos IgM que se probaron.

Ejemplo 14: Farmacocinética de constructos de cadena J bidentada

Se llevaron a cabo estudios PK, como se describió anteriormente, en ratones para evaluar las características PK de los anticuerpos IgM que incorporan las cadenas J bidentadas descritas anteriormente en el Ejemplo 12. Los resultados se proporcionan en la FIG. 26 y FIG. 27. Los resultados demuestran que las cadenas J bidentadas VJ-ABD y VJ-HSA exhibieron una buena vida media alfa y beta, y que el AUC general_{0-inf} mostró un aumento de aproximadamente el 60% en comparación con 1.5.3 IgM J-15-HSA.

Ejemplo 15: Actividad in vivo de constructos de cadena J bidentados

Los estudios con ratones NSG humanizados CD34+ fueron realizados por In-Vivo Technologies, Inc. Los ratones se compraron en el Laboratorio Jackson y se les administraron artículos de prueba mediante inyección en la vena de la cola. Se recogieron muestras de sangre en puntos temporales designados a través de la vena facial. Se enviaron muestras de sangre de ambos estudios con ratones CD34+ a IGM Biosciences Inc. para el análisis de linfocitos. Se tiñeron muestras de sangre para detectar marcadores humanos CD56, CD3, CD19 y CD45 para identificar diferentes poblaciones de linfocitos humanos. Se utilizaron esferas CountBright Absolute Counting (LifeTechnologies, C36950) para cuantificar el número absoluto de linfocitos en las muestras de sangre. Los niveles de linfocitos se graficaron y analizaron utilizando GraphPad Prism. Como se muestra en la FIG. 28, Paneles A y B, los niveles de linfocitos B se redujeron esencialmente a <10 % de los niveles previos a la dosis, y este nivel se mantuvo en el punto de tiempo de 24 horas tanto para 1.5.3V15J15HSA(K573P) como para 1.5.3V15J15HSAwt con tan solo 10 ug de artículo dosificado una sola vez.

Tabla 10: Resumen de secuencia

SEQ ID NO:	Nombre corto	Secuencia
27	Rituximab VH	QYVLEQQPSAEIYKPGASVNMCKASGYTFISYMMHWVKQTPKRLNWIGAIYFGNGST SYNQKFKGKATLTADRSGSTAYMQLSFLTERDSAVYYCAPSTYYGSDNYFNVWGAGTT VTYSA
28	Rituximab HCDR1	SYMMH
29	Rituximab HCDR2	AIYFGNGDTSYNQKFKG
30	Rituximab HCDR3	STYYGSDNYFNV
31	Rituximab VL	QIVLQGSFALISAEFGKVTMTCPASSSVSVYIHREQQKPESSKXNTLYATSNLASGVP VRFSGGGSGTSISLTLSRPEALDAATYCCQWTISNFTPEGGTKLEIKR
32	Rituximab LCDR1	RASSSVSVYIH
33	Rituximab LCDR2	ATSNLAS
34	Rituximab LCDR3	QQWTISNFFT
35	90H VH	EVCLVERGGG LVQFGGSLPL SCASGYTFI SYMMHWVKA PGGLEWYCA IYFGNGDTAY NQKFKGPTI SYDASXNTLY LQMSLPKED TAVYYCAPWV YKNSYNYFD VHQGQTLNIV SSASTNGPQV KFLAPSEST SGTAGLGL VRLYTFERYT VSRISGALTS GWITPQVILQ SSGLYSLQGV VTVESSIGT
36	90H HCDR3	VVYYSNBYWYFDV

SEQ ID NO:	Nombre corto	Secuencia
37	900 VL	DIQMTGSPSS LSAIVGDRVT ITCRASPEVS DMHWQKPS KAPKELIYAF SNLASGVNR PGGSGSTDA YLTISSLOPE DEATYYCQW SRNPPTPGQ TRVELIGTVA ADSVEIFSPS DEQLRSGTAS YVCLLNHFYF DEANVQSRVD SALQSCHEQE SYTECHSRKS TYLSSTLT LKADYERREY YACEVTHQSL
38	900LCDR1	PASSSVSYMH
39	900LCDR2	APSELAS
40	900LCDR3	QQWSENPTT
41	125 VH	EYQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYTFTSYNMHWVKQPGGLEWIGAIYPGNGDT SYNQKSKLQVITISADESTSTAYLCHSLKASDTAMYYCARSTYYGGDWYFVWGQGT VTVSS
42	125HCDR2	AIYPLTGDTSYNQKSKL
43	125HCDR3	STLYGGDWQEDV
44	125 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSVPIHWYQKPGQAPRLLIYATSEALASGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDYAVYYCQWLSNPPTFGGQTKLEIK
45	125LCDR1	RASSSVETTH
46	125LCDR2	ATSEALAS
47	125LCDR3	QDWLSNPPT
48	844 VH #2	QVQLQQPGAELEKPKGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVKQPGGLEWIGAIYPGNGDT SYNQKFKGKTTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFVWGQGT VTVSA
49	844 VH #3	QVQLQQPGAELEKPKGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVKQPGGLEWIGAIYPGNGDT SYNQKFKGKTTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFVWGQGT VTVSA
50	844 VL #5	QIVLSQSPAILTASPGKVTMTCRASTSASVYIHWYQKPGSSPKFWIYATSNLASGVF SRFSGSGSGTYSMTISSLEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGQTKLEIK
51	844 VL #5 LCDR1	RASTSASTTH
52	844 VL #6	QIVLSQSPAILTASPGKVTMTCRASTSVSYIHWYQKPGSSPKFWIYATSNLASGVF SRFSGSGSGTYSMTISSLEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGQTKLEIK
53	844 VL #6 #7 LCDR1	RASTSVSYTH
54	844 VL #7	QIVLSQSPAILTASPGKVTMTCRASTSVSYIHWYQKPGSSPKFWIYATSNLASGVF SRFSGSGSGTYSMTISSLEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGQTKLEIK
55	844 VL #8	QIVLSQSPAILTASPGKVTMTCRASSSVSYIHWYQKPGSSPKFWIYATSNLASGVF SRFSGSGSGTYSMTISSLEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGQTKLEIK
56	844 VH #10	EYQLVQSGAELEKPKGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVKQPGGLEWIGAIYPGNGDT SYNQKFKGKTTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFVWGQGT VTVSS
57	844 VH #10 HCDR3	SNYYGSSYWFDDV
58	844 VL #12	EIVLTQSPAILTASPGKVTMTCRASSSVNYMDWYQKPGSSPKFWIYATSNLASGVF SRFSGSGSGTYSMTISSLEAEDAATYYCQWSENPTTFGGQTKLEIK
59	844 VL #12 LCDR1	PAESSVNYMD
60	844 VL #12 LCDR3	QQWSENPTT
61	164 VH	QVQLQQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTSYNMHWVKQAPGQGLEWIGAIYPGNGDT SYNQKFKGKATLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCARSTYYGGDWYFVWGQGT VTVSS

[illegible]

SEQ ID NO:	Nombre corto	Secuencia
74	ADN cadena J	ATGAGGACCAATTCCTTTCTGGGAGTCTGCGGCTTTTATATAGGCTGTTLATG TGAAGGCCAGGAGATGAAAGGATTGTTCTTTGTTGACACAAATGTAGTGTGCCCC GATTACTTCCAGGATCATCTCTTCTTCCGAGATGCTAATGAGGACATTCTGACAGA AAGATCCGAATTAATTCTTCTCTGACACACAGGAGAAATATCTCTATCCAGCTCAG CATGAGAACCGAATTTGTGTACGATTGTTGTTGACCTCTGTAAAGAAATGTATCTAC AGAACTGGAGCTGGATATTCAGATAGTTACTGCTACCCAGAGCAATATCTGTGATGAA GACATGCTACAGAACCTTCTACACTTATGACAGAAATAGTGTCTACAGAGCTGTGG TCCCACTGGTATATCTGTGTGAGACCAAAATGTTGGAAACAGCCTTAACCCAGATGC CTGCTATCTGTGCTAA
75	AA cadena J	MKNHLLFWGVLAFTIKAVHYKAQEDERIVLVINKCKCARITSRIRRSSEDPNEDIVER NIIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCHKCDPTEVELDNQIVTATQSNICED SATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETRMVETALTTPDACYFD
76	aminoácido CD20 humano	MTTFNSVNGTFPAELMKGFLPMQSGKPLFPMSSLVGFTQSGFPHSESRTIGAVQIN NGLPHIALGGLLMIPAGIYAPICVTPWYFLWGGIMYTISSGLIARTEKNSPKLVKGR MIMNSLELPAALSGMLISIMDLIMIKIIRFLKMSLNFIPARTTINIYNCEDANESB KNSPTQNCYSTCALPLIGTILSYMLIFATFQELVLAGIVENEGKRTESPRKSHIVLLSA EKKHEQTLIKKEFVQLTETAGQPKUREDTLIPTOEEREESTETNFPFPPQSGEESP IENDSSP
77	IgM - Ritux ADN de la cadena pesada	CAGGTTGAGCTGCAGCAGCCCGGAGCCGAGCTGGTCAAACCTGGCGCTAGTGTGAAA TGTCATGCAAGGCATCCGATACACATTCACTAGCTATAACATGCAGCTGGGTGAAGCA GACCCCGGCGAGGGGTCTGGAGTGGATCGGAGCTATCTACCCCGGCAACGGAGACACA TCTTATAATCAGAACTTAAAGGCAAGGCCACCTGACAGCTGATAAGTCCAGCTCTA CCGATACATGCAGCTGAGTTCACGTGACAAGCGAGGACTCCGCCCTGTACTATTGCGC CCGGTCCACTTACTATGCGCAGATTGGTATTTCAATGTGTGGGAGCGAGGCACCACA GTCAACCTCTCGAGCGGCACTGCTAGCGCCCAACCCCTTTTCCCCCTCGTCTCTGTG AGAATTCCCCGTCCGATACGAGCAGCGTGGCGCTTGGCTGCTCTGACAGGACTTCCT TCCCACTCATCACTTTCTCTCTGGAAATACAAGAACAACTCTGACATCAGCAGCACC CGGGCTTCCCATCAGTCTGAGAGGGGCAAGTACGACAGCCACTCAGAGTGTCTGTG TGCCCTTCEAAGGACGTCTATGAGGGCACAGACGAACACGTGGTGTGCAAAAGTCCAGCA CCCCAAGCGCAACAAAGAAAAGAACGTGCCTCTTCCAGTGAATGCTGAGCTGCCTCCC AAAGTGAGCTCTTCTCTCCACCCCGGACGGCTTCTTCCGCAACCCCGCAAGTCCA AGCTCATCTGCGAGGCCACGGGTTCAGTCCCGGCGAGATTGAGTGTCTCTGGCTGCG CGAGGGGAAGCAGGTGGGGTCTGGGCTCACCACCGACAGGTGCGAGGCTGAGGCCAAA GAGTCTGGGCCACGACCTACAAAGGTGACGAGCAGCACTGACCATCAAGAGAGGGCACT GGCTCAGCCAGAGCATGTTCACTGCGCGGTGGATCAGAGGGGCTGACCTTCCAGCA GAATGCGTCTCCATGTGTCTCCCCGATCAGACACAGCCATCCGGGTCTTCCGCATC CCCCATCTTTGCCAGCATCTTCTCACCAGTCCACCAAGTTGACCTGCTGTGGTCA CAGACCTGACCACTATGACAGCGTGACCATCTCTGGACCGGCCAGAAATGGCGAAGC TGTGAAAACCCACACCAACATCTCCAGAGCCACCCCAATGCCACTTTACGCCCGGTG GGTGAGGCCAGCATCTCGAGGATGACTGGAATTCGGGGGAGAGGTTCACTGCAACCG TGACCCACACAGACCTGCCCTGCGCACTGAAGCAGACCATCTCCCGGCCAAGGGGT GGCCCTGCAACAGGCCCGATGTCTACTTGTGTGCCACCAAGCCCGGAGCAGCTGAACCTG CGGGAGTCCGCCACCATCAGCTGCCCTGGTGAAGGGCTTCTCTCCCGCGGAGCTCTTCC TGCAGTGGATGAGAGGGGGCAGCCCTTGTCCCGGAGAGTATGTGACAGCGCCCC AATGCCCTGAGCCCCAGGCCCGAGGCCGTAATCTTCCCGCACAGCATCTGACCGTGTCC GAAGAGGAATGGAAACAGGGGGAGACCTACACCTGCGTGGTGGCCCATGAGGCCCTGC CCAACAGGGTCACCGAGAGGACCTGAGACAAATCCACGGGTAAACCCACCTGTACAA CCTGCTCCTGCTCATCTCCGACACAGCTGGCACCTGCTACTGA
78	IgM Ritux-AA de cadena pesada	QVQLQQPGAEIVKPGASVMSCKASGCTFTSYNMMHWVQTPGRLNIGATVPCNGDT SYNQKRGKATLIADKSSSTAYNQLSLETSKPSAVVYCARSTYYGGDWYFNWAGATT VTVSGGHASAPLPLFLVSCNTEFEDTSSVAVGCLAGLFLIDSLTFENKYNKSLIST NGTFVLPAGKRYAATSCVLLPKKDVMOGTDEFAVCKVQHFNCKKERTVLPVIAELPI KISVFEVERIGFSGHPRKSLICQATGSPSPQIQVSNLRGKQVLSGVTTSCVQAEAK ESGTTLYNVSLLIKESLRLLQSMFTCPVDKGLTEQQRASGMVFDQDTALVFAI

SEQ ID NO:	Nombre corto	Secuencia
		<p> PEEFASIFLTKSETHLPLVLTLEPTVDSVTISRTDPCGEAVRKHPTISESHENATPFAV GEASICEEDDNNSEKRPCTCTVHTSLPSPKQVISEPEQWALHRPDVYLLPPAREQNL HESQCTICLNTGSEFADPTQSNQPGQFLAPKRYTGAINSEFGAPGRYTASILTIN EEENHTGCTVTCTVVALEALPHRYTERTVQKSTGKPTLVNVELVHSTAGTGY </p>
79	Ritux-ADN de cadena ligera	<p> CAAATTGTGCTGCTCAGAGTCCAGCTATCCTGAGCGCATCTCCCGGAGAGAAGGTGA CCATGACATGCAGAGCCTCCAGCTCTGCTCTCTCATCCACTGGTTCAGGCAGAAAGCC CGGCTCTCTCCCAAAACCTTGGATCTACGCCACTCTAACTCGCTAGTGGTGTGCTGCT GTGAGGTTAGTGGATCAGGGTCCGGCACCAGCTACTCTGTGACAAATCAGCCGGGTGG AGGCTGAAGACGCCCTACATACTATTGCCAGCAGTGGACTTCTAATCCCCCTACCTT CGGCGGAGGGACAAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTGTGTGCTGCTGCTGA ATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAATCCAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGAGCTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCG AAGTCAACCTCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG TTAG </p>
80	Ritux-AA de cadena ligera	<p> QINLSQSHAILASPGSEVNTMTCRASSVYIKKFPQKPGSEPHNLYATSNLASVFP VHEGCGAGTAYSLTLEHVAEDAATFYCGGSTRNPTFGGCTKLKIKPTVAAPSVFL FPPSPDEQLKRYGTASVYCLDNNFYFKAANCKWYVDNALSGNSQESVTEGDRDSTVSL SSTLLSLKALYERHKVYACENTHQSLSSEPTVTRSENPCEC </p>
81	1.5.3- IgM ADN de cadena pesada	<p> GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAGAAAGCCCGCGAGTCCCTGAAGA TCTCTTGCAAGGGCTCCGGCTACTCTTCACTTCTACTGGATCCGCTGGGTGAGGCA GATGCCCGGCAAGGGCTTGGAGTGGATGGGCATCATCTACCCCGGGGAGTCCGACACC AGGTACTCCCCCTCCTTCCAGGGCCAGGTGACCACTCTCCGCCGACAGTCCATCAACA CCGCTTACCTGCAGTGGTCTCTCCTGAAAGGCTCCGACACCGCATGTACTACTGGG CAGGCACCCCTCCATCGGCTCCGGCTCCCCCAACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACC CTGCTGACCGTGTCTCTCCGGCAGTGTAGCGCCGCCAAACCTTTTCCCCCTGGTCTCCT GTGAGAAATCCCCGTGGGTACCGAGCAGCGTGGCGTCTGGCTGCCCTCCACAGGACTT CTTTCCCGAATCCATCACTTTCTCTTGGAAATACAGAAACAATCTGCATCAGCAGC ACCCGGGGCTTCCCATCAGTCTTGAGAGGGGGCAAGTACGACGCCACCTCAGAGGTGC TGCTGCCTTCCAAGGACGTCTATGACGGGCACAGACGAAACAGTGGTGTGCAGAGTCCA GCACCCCAACGGCAACAAAGAAAGAACCTTGCTCTTCCAGTGAATGCTGAGCTGCT CCCAAGTGAAGCTTTCTGCTCCACCCCGCGACGCTCTTCTGGGCAACCCCGCAAGT CCAAGCTCATCTCCAGGGCCACGGGTTTCAGTCCCGGCGAGATTGAGGTCTCTGGCT CGCGAGGGGAACAGGTGCGGTCTGGCGTCAACACGGACAGGTGAGGCTGAGGCTGAGGCC AAAGAGTCTGGGCCACGACCTACAAGTGAACGACACACTGACCATCAAGAGAGAGCG ACTGCTCAGCCAGAGCATGTTCACTTGGCGGTGGATCAGAGGGGCTGACCTTCCA GCAGAAATGCTCTCATGTGTGTCTCCCGATCAGACACAGCCATCCGGGTCTTCCGC ATCCCCCATCTCTTGGCAGCATCTTCTCACCAGTCCACCAAGTTCACCTGCTCTGG TCACAGACCTGACCACTATGACAGCGTGAACATCTCTTGGAGCCCGCAGAAATGGCGA AGCTGTGAAARCCACACCAACATCTCCGAGAGCCACCCCAATGCCACTTTCAGCGCC GTGGGTGAGGCCAGCATCTCCAGGATGACTGGAATTCGGGGAGAGGTTCAAGTGA CCGTGACCCACACAGACCTGCCCTCGGCACCTGAAGCAGACCATCTCCCGGCCCAAGGG GGTGSCCTTCACAGSGCCGATGTCTACTTGTGSCCACCAGCCCGGAGCAGTGAAC CTGCGGGAGTCCGGCACCATCAGTGCTCTGGTGAAGGGCTTCTCTCCCGGGACGCTCT TCTGTCAATGGATGCAGAGGGGCGAGGCTTGTCTCCCGGAGAGATATGTGACCAAGGCG CCCAATGCTGAGCCCGCAGGCCCCAGGGCGGTACTTGGCCACAGCATCTTGACCGGTG TCCGAGAGAGGATGGAACACGGGGGAGACCTACACTCTGCTGGTGAACCATGAGGCCC TGCCCAACAGGTTCAACGAGAGCCGTGGACAGTCCACCGGTAAACCCACCCCTGTA CAACCTGTCTCTGCTGATGTCCGACACAGCTGGCAGTCTCTACTGA </p>

SEQ ID NO:	Nombre corto	Secuencia
82	1.5.3 IgM AA de cadena pesada	EVQDVQSGAEVHRFGESLPSCHSSGYSPTSTWIGTAPQMPKSLERNGILTPGCSDT RYSPSPQGGVTISADESTIAYLQMSLLYASDIAMTYCAPRPSYSGSPNFQYWGQGT LPTVSSQSAASPTLFTLVSCENSPSUTSSVAVGCLLAQSTLPDSITTSNKYSNHSDLS3 TSGTTSVLPSSGTAATSQVLLPSKIVMGGTPEHCTEVGHEPNKKEPNVLPVIAQLP FAYEVFVPPRGGFFGNPRKSLICQATGFSADQICVSWIREGKQVGSSEVTTDQVQAEA KESGKTYKAVITLLIRASDNLGQSNKTCRYDHHGLTFQSNASQKVPDQSTALGVTA LPSSASIFLTGSKTLTCLVTHLITTYLGVTTISWIRQNGEAVETHINISGSHHATFSA VGRASICEEDLWNSCERPTCTVHTIDLSEPLKQTISSRFQVALHRRPSVYLLPAREQIN LPRZATITCLVTGSSADVFVQRMQSGQPISEKIVTEAFMPFQABRRYFANSILTV GSEEDNTGETYCVVAHEALPHKUTERTVGRSTGKPTLYNVSLDGHITAGTCY
83	1.5.3 ADN de cadena ligera	GACATCTGTGATGACCCAGACGCCCCCTGTCCTCCCCCTGACCCCTGGCCAGCCCGCT CCATCTCCTGCAGGTCTCTCCAGTCCCTGGTGTACTCGGACGGCAACACCTACCTGTCTC CTGGCTGCAGCAGAGGCCCGCCAGCCCCCAGGCTGCTGATCTACAAGATCTCCAAC AGGTTCTCCCGCGTSCCCGACAGGTTCTCCGGCTCCGGCGCCGGCACCAGACTTCACCC TGAAGATCTCCAGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGCCCTGTACTACTCGCTGCAGGCCAC CCAGTTCCCCCTGACCTTCGGCGCGCGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCT GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTGAANTCTGGAAGTGCCT CTGTTGTGTGCTGCTGTAATCACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGT GGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCAGCTACAGCCTCAGCAGCAGCCTGACGCTGAGCAAGCAGCACTACGACAAAC ACAAAGTCTACGCTCGCAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAGAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTAG
84	1.5.3 AA de cadena ligera	DIYVDTGTFLESPVTLQPSLISCRPSQRLVYERNTYLSWLDQRFQGFRLIYKTEH RFSQVDFRFGAGASTDFTLNISSVEAEIVGVVYCVQATQFPIITFGGSTKVEIKPTVA AFENTLFPSSDELLKSGTSSVCLLNNTYPREAKVQWVONALQSGNSQSEVIEQUSH DPTYSLSSTTLRKAHYLERRVACEVTRQGLSSPVTSFNRGCH
85	región constante IgA1 humana aa P01876	ASPTSPKVFPLSLCSTQFDGNVVIACLVQGGFFPQEPFLSVTWSESQGVATARNFFPSQD ASQDLNFTSSQLTLPAQTCLAGSEVICHVKNHTNPSQVVPVPCFVPSTPTTSPHSTFP TPSPSCCHFRSLRRLPALEIDLLGSEANLTCTLTGLRDSAGVTFTWTFSSGKSAVQGF PERDLGGCYGVSSVLPQCAEPWNHGRKTETCTAAYPESKTLPLATLSKSGNTFRPEVHL LPPFSEELAINELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSCGTT TFAVTSILPVAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIIDRLACKPTHVNVSVMAEV DGTCY
86	Región constante IgA2 humana aa P01877	ASPTSPKVFPLSLSLISQFENVVIACLVQGGFFPQEPFLSVTWSELPQVYATARNFFPSQD ASQDLNFTSSQLTLPAQTCLAGSEVICHVKNHTNPSQVVPVPCFVPSTPTTSPHSTFP RRLPALEIDLLGSEANLTCTLTGLRDSAGVTFTWTFSSGKSAVQGFPERDLGGCYGVSS VLPQCAEPWNHGRKTETCTAAYPESKTLPLATLSKSGNTFRPEVHLPPFSEELAINEL VTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSCGTTTFAVTSILPVAAE DWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIIDRLACKPTHVNVSVMAEVDGTCY
87	Precursor del componente secretor humano	MLLPVLTCLLAVFPAISTRSPIFGPEEVNVEGNSV3ITCYPPPTSVNRHTPRYWCQ GAPGGCITLISSEGYVSSKYAGRANLTNFFENGTFVYVNIQLSQQDSSGRYKGLGINS PGLSFDVSVLEVSQGPGLINDTKVYTVDLGRTVTINCPFKYENAQRKSLYKIGLVPV LVIDSSGYVNPNTGRIRLDIQTGQLLFSVVIQRLRLSDAGQYLCQAGDSNENKKN ADLQVLKPEPELVYEDLNGSVTFRCALGFVANVAKFLCRQSSGEMCVVNTLGKRA FAFEGRIILLNPQDKGSPSVITGLRKEDAGRYLCGAHSDGQLQEGSPIQAWOLFVNE ESTIPRSPTVYKGVAGGSVAVLCPYNRKESKSIKZWCLWGAQNGRCPLLVDSGCVK AQYEGRLSLLLEPGNGTFTVILNQLTSPDAGFYWCLTNGDTLWRTTVRIKIIEGEPNL KVPGNVTAVLGETLKVPCHFPCKFSSYKEYWCKWNTGCCALPSQDEGFSKAFVNCDE NSRLVSLITLNLVTRADEGWYCGVQCHFYGETAAVYVAVERKKAAGSRDVSARADA AFLEKVLDSGFREIENKAIQDFRLFAEEKAVADTFDQADGSRASVLSGSSSEQGGSSP ALVSTLVPLGLVLAVGAVAGVARARHPRKNVDPVSIRSVRTDISMSDFENSPEFGAND NMGASSITQETSLGKKEEFVATTESTTETNEPKKAKRSSKEEAEMAYNDFLQSSSTVA ABAQGGPQEA

[illegible]

SEQ ID NO:	Nombre corto	Secuencia
		GAAGGCGTCAATGGCCAAACAGCGCGCTTAAGTGGCGATCGCTTCAGAAATTCGGAGAG AGGGCGTTCAAAGCGTGGGCGCTCGCGAGACTGTTCGCAGAGATTCCCTAAGGCGGAAT TTGCGAGAGGTATCGAAGCTCTTGACAGACCTCACAAAGGTCCACACCGAATGTTGCA TGGAGACCTGCTTGAGTGGCGCGATCTATAGGCGAGACCTCGCAAAGTACATTTGTCAG AATCAGGACAGCAATTAGCTCCAAGCTGAAAGAGTGTCTGTGAGAAAGCCCTTTGCTGGAAA AATCCCACTGTATCGCCGAGGTAGAAAACGATGAAATGCCCGCTGATCTTCCCTCGCT GGCGCGAGACTTCGTGAGTGGAGGACGTCTGCAAGAAATACCGCAGAGGCAAAAAT GTGTTTCTTGGAAATGTTCCCTTATGAGTATGCGAGAAGGACCCGGATTATTCCGTGG TACTGCTCTTGGGATTGGCGAAAACGTACGAAACAAACGCTTGAGAAGTGTGTGCGGGC TGGCGACCCGATGAGTGTACGCGCAAGGTATTTGATGAGTTAAACCTCTTGTGAG GAAACCCAGAAATCTTATCAAGCAGAACTGCGAGCTTTTCAAGCAGTTGGGTGAATACA AATTCAGAACCGGCTTCTGGTGAAGTATACCAAGAAAGTACCTCAAGTCTCAACACC CACACTCGTCGAGGTGTACGGAACCTCGGAAAGTAGGCTCGAAGTGTGTAAACAC CCAGAGGCGAAGCGCATGCCCTGTGCGGAGGACTACCTCTCGGTAGTGTGAATCAAC TGTGTGTCTCCAGGAAAAGACGCGGCTGTACAGCCGCGTCACAAAGTGTGACACGGA GAGCTTGGTCAATAGACGCGCTCTTCTCAGCGCTGGAGGTGGATGAGACATACGTC CCGAAAGAGTTTAAACGCGGAAACGTTTACTTTTCATGCTGATATCTGTACGTTGTGAG AGAAAGAAAGGCAATCAAGAAACAAACTCGGCTTGTGGAAGTGTGAAGCACAACCC GAAGCGACTAAGGAACAGCTCAAGGCGGTGATGGATGACTTTGCCCGCTGTGAGAG AAATGCTGTAAAGCAGACGATAAGGAGACTGTGTTTGGCGAAGAGGGACCTAAAGCTTG TTGCTGCAAGTCAAGCTGCCCTTAGGCTTAGGAGCGGAGGATCTGTGGCGGTGCTTC TGGCGGAGCGGCTCTCAGGAAGATGAGCGGATCGTCTGCTGGTGACAAACAGTGCAG TGGCGCGGATCAGCTCCCGGATCATCCGCTCCTCGGAGGATCCCAACGAGGACATCG TGGACGGAACATCAGAATCATCGTCCCGCTGAAACAACCGCGAGAATCTCTCGACCC CACCAGCCCTCTCGGACCAAGATTCTGTATCCACCTGTCCGACCTTGTGCAAGAGATGC GACCTTACCGAGGTGGAAGTGGACAACAGATCGTGACCGCGCACCCAGTCAACATCT GCGACGAGGACTCCGCCACCGAGACATGCTACACCTACGACCGGAACAAGTGTACAC CGCCGTGCTGCTCTGTGTACGGCGCGAGACAAAGATGTTGGAARCCGCCCTGACC CCCGACGCTGCTATCCTGATTAG
94	HSA15J AA	MRWYTFISLLFLPSEXYSESVTPSDAHNSFVAHHPKDLGEENFYKLVLIAPAOYLCC FFEDHVKLVNKEVTEFARKTCADESAEMCKSLHLFGUKLQVATLRETLYGEMALUCA KQLEPERGECFLQHKDQNSLPLRVKCEVDMCTAFHDKNETFLKQCLVLIAPRHLYFY APELLFPARDIKAAFTETCCQANDMAACLLPRLRLRDEGFASAYQRLKCAKSLKPFGE PAFKWAVARLSQPPFPAEFAYVSKLVTSITRVHTECHGBLLBCADDPADLAKYICE NQSLISKLKSCCKPLLEKSHCLAEVNDMPAULESLAARDFTSKVCHNYAARD VFLQMLYEVARPHHDYSWILLFLAKTYETLLEKCCBAADPHETAKVVEDEPHLVE TPONLIRQNCYLPKQGEYKFNALLVNYTKVFOVETPTLVTVRNLSKVGNAACKRH FEAKRMFCARDYLSVVLNQLCVLRENTPVSDRVTKCETRELVNRAKCFBALEVDETYV PKFNARTFTTHADICTLSEEDGQIRKQTAIVELVKNHFKATKEQLHVMDFAAEVE NCKRADDKETCPAEEGPKLVAAQQAALSLGGGCTGGGCGGGGCTQEDERIVLVNKK GASITSRITRSEEDENEDIVENNIHLIVPLNNENISEFTSPLTRREVYHLSDLCKKC DPEVVLDRQLVTATQSHICLEDGATETCTIDENKCYTAVVPLVYGGGTGNNVETALT FDACVSD
95	ADN J15HSA	ATGAAGAACCATCTGCTGTTCTGGGCGCTGCTGGCCGTGTTTCATCAAGGCGGTGCACG TGAAGGCCCGAGGAAGATGAGCGGATCGTGTGTTGGACAACAAGTGCAAGTGGCGCCG GATCACCTCCCGATCATCCGCTCTCCGAGGATCCCAACGAGGACATCTGGAACGG AACATCAGAATCATCTGCGCCCTGAACAACCCCGAGAATCTTCCGACCCACACAGCC CTCTGCGGACGAGATTCTGTGACCACTGTCCGACCTGTGCAAGAAGTGGGACCTAC CGAGGTGGAAGTGGACAACAGATCGTGACCGCCACCCAGTCCAACATCTGCGACGAG GACTTCGGCACCAGACATGCTACACCTACGACCGGAACAAGTGCTACACCGCCGTGG TGCTCTGGTGTACGGCGGCGAGACAAAGATGGTGGAAACCGCCCTGACCCCGAGTGC CTGCTATCTTGATGGAGCGCGAGGATCTGGTGGCGGTGGTTCTGGCGGAGGGGCTCT GACGCCCACAAATCGGAGGTAGCGCACCGGTTCAAAGACTTGGGAGAGGAAAATTTA AGGCCCTTGTACTCATTGCGTTTGGCGAGTATTTGCAGCAGTGGCCCAFTCGAGGACCA TETCAAACCTGTCAACGAAGTGACAGAGTTTCCGAAAACCTTGGTGGCGGACGAATCC

SEQ ID NO:	Nombre corto	Secuencia
		<p> GGCGAGAACTGTCACAACTCCCTGCATACGTTGTTCCGGGGATAAGCTCTGTACCCGTAG CCACCTTGAGGGGAACTTACGGGGAAATGGCGGACTGTTCCGCTAAGCAGGAGCCGGA ACGGAAACGAGTCTTTCCCTCAGCATAAGGATGACAACCCCAACCTCCCTAGATTGGTC AGACCCGAAAGTGGATGTGATGTGCACAGCATTCOCATGACAAATGAGGAASCTTTCTCA AAAAGTATTTGTACGAGATTGCCCGACGACACCCCTATTTCTACGCTCCCGAGTTGCT CTTCTTCCGSAACGGTATAAAGTGGCTTTACTGAATGCTGTCAAGCAGGAGGACAAG GCCGATGCTCTCTTCCAAATTGGATGAACTCCCGCATGAAGGGGAAGGCGTCATCGG CCAAACAGSCGGCTTAAGTGCCTCATCGCTTCAAAATTCCGAGAGAGGCGCTTCAAGC GTGGGCGCTCGCGAGACTGTCCGAGAGATTCCCTAAGGCGGAATTTGCAGAGGTATCG AAGCTCTGCAGAGACCTCACAAAGGTCCACACCGAATGTTGCCATGGAGACCTGCTTG AGTCCGCGCATGATAGGGCAGACCTCGCAAAGTACATTTGTGAGAATCAGGACAGCAT TAGCTCCAAGCTGAAAGAGTCTGTGAGAAGCCTTTGCTGGAAAAATCCCACTGTATC GCCGAGGTAGAAACGATGAATGCCCCGCTGATCTTCCCTCGCTGGCGGACAGCTTCC TCGASTCGAAGGACGTCTGCAAAATTAAGCAGAGGCAAAAGATGTGTTCTTTGGAAT GTTCTTTATGAGTATGCGAGAAGGACCCCGATTATTCGGTGGTACTGCTCTTGCGA TTGGCGAAAACTACGAAACAACGCTTGAGAAGTETTTGTCGGCTGCGGACCCGCATG AGTGTACGCCAAGGTATTTGATGASTTTAAACCTCTTGTGAGGAAACCCAGAACTCT TATCAAGCAGAACTCCGAGCTTTTCAAGCAGTTGGGTGAATACAANTCCAGAACCGG CTTCTGGTGAGGTATACCAAGAAAGTACCTCAAGTCTCAACCCACACTCCGTCCGAGG TGTCAAGGAACCTCGGGAAAGTAGGGTGAAGTCTGTAAACACCCAGAGGCCAAGCG CATGCCCTGTGCGGAGGACTACCTCTCGGTAGTGTGAAATCAACTGTGTGCTCCAC GAAAAGACGCCCGTCTCAGACCGCGCTCACAAAGTGTCTGACGGAGAGCGCTGCTCAATA GACGCCCTCTCTCTCAGCGCTGAGGTTGGATGAGACATACGTCCCGAASAGTTTAA CGCCGAAACGTTTACTTTTCACTGCTGATATCTGTACGTTGTGAGAGAAGGAAAGGCAA ATCAGAAACAAACTGCCCTTGTGGAAGTGGTGAAGCACAACCCGAAGCGCAGTAGG AACACTCAAGCGCGGTGATGGATGACTTTGCCGCGTTCTGTAGAGAAATGCTGTAAAGC AGACGATAAGGAGACTTGTTTTGGGAAGAGGGACCTAAACTTGTGTCTGCAAGTCAA GCTGCCCTTAGGCTTATAG </p>
96	J15HSA AA	<p> MNHLLFWGVLAFTTRAVRVKAELEERTVVLVNRCKCAFTPEPTIRSERDMEDIVER NHTTUPLNBNBNISSPTSLPTAFVYHLSDLQKCOPTFVLQNGIVTATQSNLCDF DEATETCYTIDRNECTAIVPLVTGGETKNIETALTQACVPSGGGGGGGGGGGGGG DARESEVAHRRFDLGEENFKALVLTAFATYLOCCFFESHVRLVNEVTEFAATCVADES AENCUKSLHYLPGLFLCTVNTLAETTGEMADDCARDEPEPNECFDHHXDDNPHLPLV/ RPEVDVHCIAFDHNEETFLGQVLYETARSHPYFAPELLPTAKRYKAATTECCGAAR AACLCHKLELRDECGASFAQPLFCASLQRTGERSATKAGAVARLSQSTPFAATFATVS KLVITQLYVHTCCGSDLLSCADQKADLAKYICENQDNLSSKLECCCKPLLEKSHCI AEVLENDMPALPLSLAARFVEIKVNCNIAEAKDVFLEHFLYEYARSHERTSVYLLER DASTYETTLERCCAAADHRSYAMVDLFFPLVTPQNLKONCEFFGLGCTYKQNA LVRYTKVFPQVSTPTLVESYSHLEKVSSEKCNHFEAKEMPCAEEDYLSVYVNLQVLIH RKTVAEDRVTSCCTESLVNRSQCFSALEVDETVYVKEFNAPTTFHRASTCTLSEKERQ IENQIALVELVHKKIKATREQLKAVMDLPAAPVKKCKADDFETCFALGSPDLVAASQ AALGL </p>
97	ADN V15J15ABD	<p> ATGGGGTGGTCTACATATCTCTGTTCTCTGGTGGCCACCGCCACTGGCGTGCCTCAC AGGTSCAGCTGGTGCAGTCTGGCSCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCTTGAAGGT GTCTTGCAAGGCTTCGGCTACACCTTCATCAGCTACACCATGCAGCTGGGTGCGACAG GCCCCGACAGGGCTGGPATGGATGGGCTACATCAACCTAGATCTGGCTACACCC ACTACCAACCAGAAGCTGAAGGACAAGGCCACCTGACCGCCGACAAGTCTGCCTCCAC CGCCTACATGGAAGTGTCTCTCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC AGATCCGCCCTACTACGACTACGACCGGCTTCCGCTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGA CAGTCTCTAGCGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTAGTGGCGGTGGCGGATCTGA TATCCAGATGACCCAGTCCCTCTCCAGCCTGTCTGCTCTGTGGGCGACAGAGTGACA ATTACCTGCTCCGCCAGCTCCTCGGTGCTTACATGAAGTGGTATCAGCASAAGCCCG GCAAGGCCCCCAAGCGGCTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCTGGCTGGCCTC CAGATTCTCCGCTCTGGCTGTGGCACCAGCTTACCCCTGACCATCAGCTCCCTGCAG CCCGAGGACTTCCGACCTACTACTCCAGCAGTGGTCTCCAAACCTTCCACCTTTG </p>

[illegible]

SEQ ID NO:	Nombre corto	Secuencia
		AAAGCGTGGGCGCTGCGGAGACTGTGCGAGAGATTCCCTAAGCGGGAATTTGCAGAGG TATCGAAGCTCGTGACAGACCTCACAAAGGTCCACACCGAATGTTGCCATGAGAGCCT GCTTGAAGTGGGCGGATCATAGGGCAGACCTCCGAAAGTACATTTGTGAGAAATCAGGAC AGCATTAGCTCCAGCTGAAGAGTCTCTGTGAGAAAGCCTTTGCTGGAAAAATCCCACT GTATCGCGGAGGTAGAAAACGATGAATGCCGCTGATCTTCCCTGCTGCGGCGCAGA CTTCCTCGAAGTGAAGGACCTCTGCAAGAATACCCAGAGGCAAAAGATGTGTTTCTT GGAATGTTCTTTATGAGTATGCGAGAAGGACCCGGATTATTCGCTGGTACTGCTCT TGCGATTGGCGAAAAACCTACGAAACAACGCTTGAGAAGTGTGTGCGGCTGCGGACCC GCATGAGTGTACGCCCAAGGTATTTGATGAGTTTAAACCTCTTGTGAGGGAACCCAG AATCTTATCAAGCAGAACTGCGAGCTTTTCAAGCAGTTGGGTGAATACAAATTCAGAG ACCGGCTTCTGGTGAGGTATACCAAGAAAGTACCTCAAGTCTCAACACCCACACTCGT CGAGGTGTCAAGCAACCTCGGAAAGTATAGGCTCGAAGTGTGTAAACACCCAGAGGCC AAGCGCATGCCCTGTGCGGAGGACTACCTCTCGGTAGTGTGAATCAACTGTGTCTCC TCCACGAAAAGAGCGCGGTSTCAGACCGGCTCACAAGTGTCTGACCGGAGAGCCTGGT CAATAGAGGCCCTGCTTCTCAGCGCTGGAGGTGGATGAGACATACGTCGCGAAAGAG TTTAACGCGCAACGTTTACTTTTCATGCTGATATCTGTACCTTGTGAGAAAGGAAA GGCAATCAAGAAACAACTGCGCTTGTGGAAGTGGTGAAGCACAACCGGAAGGCGAC TAAGGAACAGCTGAAGGCGGTGATGGATGACTTTCGCGGCTTGGTAGAGAAATGCTGT AAAGCAGACGATAAGGAGACTTGTTTTGGGGAAGAGGACCTAAACTTGTGCTGCAAG GTCAAGCTGCCCTTAGGCTTATAG
100	V15115HSA(K351P) AA	MGNYTTLFVATATTVESDVLQVSGAEVKKFASVYVSCAKSEPTTISTMGWVRV ADGQGLEHMGYINERQNTBYNQLNDKATLEADKASTAYMELSELGSEETPTKCA KJATYDYDGPATWGGCTLLVTVSGGGGGSGGGGGGGGGSHRCHTCKTPELSSVGGVY TTCASASSVYMMWYCKFENAPKELIYDTNKLASGVSPFFGCGESGDTFTLTLSLQ PEDATYYCQWSSNPTFGGATVYELXSGGGSGGGGGGGGGGQELERTVLVDNRKNC ARITERTIPSSRLPNELIVEMIRIIVPLNNRNTSLTTSPLPTREYVHLSLCLKKSD PTREVLNQVVTATQNTLDEDEATETCTYTDENKCYTANVPLVYGGGTMTETALT DACYEDGGGSGGGGGSGGGSDAKKSEVARRPKULGEENPKAIULIAPQYVGGCFEK DHYKLWNEVTEHARTCAVESALNCKSLRTLTGKLTCTVATLLETYGENADCCAKQE PERNECFLOHKKDORPNLPLVRPEVDVNCCTAFHDNEETFLKPLYLEIARRNPYFYAGE LLFTAKRYKAARETECCQAADSAACLLPKLPELSEDEGRASSAPQRLKCAELQKFGRAF KARAVARLSQPFKAEFAEVSKLVDTLTQVHTCCCHGSLLECADIRADLAKYICEND SLSSKLKECCERPLLEKSHCIAVENDEMPADLPPLALFVESHVCKVNYAZAKVFL GMFLVYARRHEDYVWVLLSRKATYESTLEKCCAAASPHETAKVDFEFVSLVEEPQ NLIKQNGELFKQLGEYRFGNALIMRYTKEVPQVSIPTLVEGRLGKGGSGCCGHFEA KEMPCAEDYLESVVLNCLVLRHETPFVSDRWTKCTESLVNRRPFCPSALEVDSYVPEKE FNAETETPHADICTLSENERQIKYOTALVELVYKHKFKATKEQLFAMVDDFAATVENCC KADNRETFAREGKNGASQAALGL
101	V15115HSA(wt) DNA	ATGGGGTGGTCTACATTATCCTGTTCTCTCGTGCCACCGGCACTGGCGTCACTCAC AGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGCCGCTCCGTGAAGGT GTCTTGCAAGGCTCGGGCTACACCTTCATCAGCTACACCAAGCACTGGTGGACAG GCCCTTGACAGGGGCTGGAATGGATGGGCTACATCAACCCTAGATCTGGCTACACCC ACTACAACCGAAGCTGAAGGACAAAGGCCACCTGACCGCGGACAAAGTCTSCCTCCAC CGCTACATGGAAGTGTCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGTGCC AGATCCGCCTACTAGGACTACGACGCGCTTCGCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGA CAGTGTCTAGCGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTAGTGGCGGTGGCGGATCTGA TATCCAGATGATCCAGTCCCTCCAGCCTGTCTGCTCTGTGGGGGACAGAGTGACA ATTACCTGCTCCGCGAGCTCTCCGTGTCTTACATGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCCAAGCGGCTGATCTACGACACCTCCAAAGCTGGCCTCTGGCGTGGCCTC CAGATTCTCCGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTTACCTTGACCATCAGCTCCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCCACTACTACTGCCAGCAGTGGTCCFCCAACCTCCCACTTTG GCGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAGGCGGCGGAGGAAGCGGGGAGGCGGTTCTGG GGGTGGTGGATCTCAGCAAGATGAGCGGATCGTGGTGGTGGACAAAGTSCAAGTGC GCCCGGATCACTCCCGGATCATCCGTCCTCCGAGGATCCCAACGAGGACATCGTGG AACGGAACATCAGAAATCATCTGTCCTTGAACAAACCGAGAGACATCTCCGACCCAC

SEQ ID NO:	Nombre corto	Secuencia
		<p> CAGCCCTCTGCGGACCAGATTCTGTGACCACTGTCCGACCTGTGCAAGAAGTGGGAC CCTACCGGAGGTGGAACTGGACAAACAGATCGTGACCGCCACCCAGTCCAACATCTGCG ACGAGGACTCCGCCACCGAGACATGCTACACCTACGACCGGAACAAGTGCTACACCGC CGTGCTGCCCTCTGGTGTACGGCGCGGAGACAAAGATGCTGGAACCGCCCTGACCCCC GACGCTCTGATCTGTATGGAGGCGGAGGATCTGTGCGCGGTGTTCTGGCGGAGGG GCTCTGACGCGCCCAAACTGGAGGTAGCGCACCCTTTCAAAGACTTGGGCAAGAAAA CTTTAAGGCCCTTGTACTCATTGCGTTTGCSCAGTATTTGCAGCASTGCCATTCSAG GACCAAGTCAAACCTGTCAACGAAGTGACAGAGTTTGGGAAAACCTTGGCTGCGCGAGC AATCCGCGGAGAACTGTGACAAGTCCCTGCATACCTTGTTCGGGCGATAAGCCTGTGTAC CCTAGCGCACTTGAGGGGAACTTACGCGGAAATGCGCGACTGTTGCGCTAAGCAGSAG CGGCAACCGGAACGAGTGTTCCTTCAGCATAAGGATGACAACCCCAACCTCCCTAGAT TGGTCAGACCCGAAGTGGATGTGTGTGCACAGCATTCATGACAATGAGGAACCTT TCTCAAAAAGTATTTGTACGAGATTGCCCGACGACACCCCTATTTCTACGCTCCCGAG TTGCTCTTCTTCGCGAAACGCTATAAAGCTGCCCTTACTGAATGCTGTCAAGGAGCGG ACAAGGCCCGCATGCTTCCTTCCCAAATTTGATGAATCCGCGATGAAGGGGAGGCGCTC AATCGGCCAAACGAGCGGCTTAAGTSCCGCATCGCTTCAGAAATTCGAGAGAGGCGCTTC AAGCGTGGGCGCTGCGGAGACTGTGCGCAGAGTTCCTTAAGCGGAATTTGCAAGG TATCGAAGCTCGTGACAGACCTCACAAGGTCACACCGAAGTGTTCAGCATGGAGACCT GCTTGAGTSCGCGGATGATAGGCGAGACCTCGCAAGTACATTTGTGAGAATCAGGAC AGCATTAGCTCCAAGCTGAAAGAGTGTGTGTGAGAAGCCTTTGCTGGAAAAATCCCACT GTATCGCCGAGGTAGAAAACGATGAAATGCCCGCTGATCTTCCCTCGCTGGCGGCGAGA CTTCGTCGAGTCCGAAGGACGCTCTGCAAGAAATACGCAAGGCAAGGCAAGAGATGTGTTCTT GGAAATGTTCTTTATGASTATGCGAGAAGCGACCGGATTAATCCCTGCTGATGCTGT TGGGATTGGCGAAAAACGTAAGAAACACGCTTGAGAAGTGTGTGTCGGGCTGCCGAGCC GCATGAGTGTACGCCAAGGTATTTGATGAGTTTAAACCTCTGTGCGAGGAACCCGAG AATCTTATCAAGCAGAACTGCGAGCTTTTCAAGCAGTTGGGTGAATACAAATTCAGAA ACGCGCTTCTGGTGAGGTATACCAAGAAAGTACCTCAAGTCTCAACACCCAGACTCGT CGAGGTGTACCGGAACCTCGGGAAGTAGGCTCGAAGTGTGTAAACACCCAGAGGCC AAGCGCATGCCCTGTGCGGAGGACTACCTCTCGGTAAGTGTGAATCAACTGTGTGCTC TCCAGGAAAAAGCGCCGTGTGAGACCCGCTCACAAAGTGTGCAAGCGAGAGCTGGT CAATAGACGCCCCCTGCTTCTCAGCGCTGGAGGTGGATGAGACATACCTCCCGAAAGAG TTTAAGCGCGAAACGTTTACTTTTCATGCTGATATCTGTACGTTGTGAGAGAAGGAAA GGCAATCAAGAAACAAACTGCGCTTGTGGAAGTGGTGAAGCACAAACCGAAGGGGAC TAAGGAACAGCTGAAGGCGGTGATGGATGACTTTGCCGCTTCTGTAGAGAAATGCTGT AAGCGAGAGGATAAGGAGACTTGTTCGGAAGAGGGAAGAACTTGTGTGCTGCA GTCAAGCTGCCCTTAGGCTTATAG </p>
102	V1515HSA1 wd AA	<p> MNSSTTLFLNATAGVHSQVVLVQSGAEVKKPESVYVVECKASCTPELSYIMNVAQ NPSQGLERMGXINPRSGCTHYHQKLDKATLTADKSAATAIMELSLPSERTAVYKCA RSPYNDYGGTAINGOSTEVTVEGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG ITCSASSSVYMMWYQKPKAKAPLITYDSKIASCGVPEPPSGSCSTDTPLTISLQ PERFATYQQGWSNPNPTGGGTFVLIKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG ARITARIIRSSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNEENI3DPTFVLSIRFVYHLSGLCKKCD PTEVELDNQIVATQSNICDEDATETCYTTERNNCYTAVVPLVYGGETKMVETALTE DA-YPDGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG DHVKLVNEVTEFAKTCVADEEAENCLKSLHTLFGDKLCTVATLPEITYGEMADCCANCE PERNECFLOHKDINPHLRIRAFEDVMCTAFPHDNEETFLKYLLEYARPHPYFIAP LLFTAHRYKAAPTECCOAAKACALLPKLDELRLDEGKASSARGLNCAAGLQKRGERRAI KAGAVARLSQREPKARPAENSKVLTDLTKVHTECHGCLLEGADDAALASTYTCNQD STSSKLECCCKPILSKNCTAFVENDENFADIPSLAADFVESKDVGNVYASAKIVFL GMFLTRTAKNHPDYVYLLRLASTYETTLERCAALPHETARVFEDEPKLVEEPQ NLIEQNEELFPGIAGETKFNAILVBYTKYVQVNSTPLVEVYNNICKVGSKCTPHFPA KNMPCREDYLSVYVNLQVLEHETPSVDRVTNCTESLYNNRPKCFSALEVDSETYVFER FHEISYFEADICTLSEKRNQIRSGALVELERKPKATKEDLKAHVNUDEAATVENGC KATVSEDTTAAEENKLVAAAGGL </p>

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión que comprende un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA con una cadena J modificada, en la que el anticuerpo IgG/IgM o IgG/IgA contiene una pieza de cola IgM o IgA en la cadena pesada IgG, en donde la cadena J modificada comprende una fracción moduladora de la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) que reduce la eliminación del anticuerpo de la circulación de un sujeto, en el que el resto que modula el ADME se localiza en el extremo C-terminal o N-terminal de la cadena J modificada, y en donde el resto que modula el ADME comprende una proteína albúmina, un péptido de unión a albúmina, un fragmento de anticuerpo de unión a albúmina, un péptido de unión a FcRn o un fragmento de anticuerpo de unión a FcRn.
2. La molécula de unión de la reivindicación 1, en donde el resto que modula el ADME comprende albúmina sérica humana.
3. Una molécula de unión que comprende un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA con una cadena J modificada, en la que el anticuerpo IgG/IgM o IgG/IgA contiene una pieza de cola IgM o IgA en la cadena pesada IgG, en donde la cadena J modificada comprende un resto que modula el ADME que aumenta una concentración de la molécula de unión en un tejido del sistema nervioso central de un sujeto, en donde el resto que modula el ADME se localiza en el extremo C-terminal o N-terminal de la cadena J modificada, y en donde el resto que modula el ADME comprende una proteína de transferrina, una proteína de leptina, un fragmento de anticuerpo de unión al receptor de transferrina, un fragmento de anticuerpo de unión a transferrina, un fragmento de anticuerpo de unión al receptor de insulina, un fragmento de anticuerpo de unión al receptor de IGF-1 o un fragmento de anticuerpo de unión al receptor de leptina.
4. La molécula de unión de la reivindicación 3, en donde el resto que modula el ADME comprende una proteína transferrina o una proteína leptina.
5. Una molécula de unión que comprende un anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA con una cadena J modificada, en donde el anticuerpo IgG/IgM o IgG/IgA contiene una pieza de cola IgM o IgA en la cadena pesada IgG, en donde la cadena J modificada comprende un resto que modula el ADME que aumenta la retención de la molécula de unión en un espacio extravascular de un sujeto, en donde el resto que modula el ADME se localiza en el extremo C-terminal o N-terminal de la cadena J modificada, y en donde el resto que modula el ADME comprende una proteína de unión al ácido hialurónico (HABP), un fragmento de anticuerpo de unión al ácido hialurónico, una proteína TSG-6 o un fragmento de anticuerpo de unión a TSG-6.
6. La molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a una diana de cáncer hematológico que es CD20.
7. La molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a la beta-secretasa 1 (BACE).
8. La molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cadena J modificada comprende la secuencia de cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1.
9. La molécula de unión según la reivindicación 8, en donde el resto que modula el ADME se introduce en la secuencia de cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 mediante fusión directa o indirecta, y en la que la fusión indirecta es a través de un enlazador peptídico.
10. La molécula de unión según la reivindicación 8, en la que el resto que modula el ADME se introduce en la secuencia de cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 mediante derivatización química o quimioenzimática.
11. La molécula de unión según la reivindicación 10, en donde el resto que modula el ADME se introduce en la cadena J humana nativa mediante un enlazador escindible o no escindible, en donde el enlazador escindible es un enlazador químicamente lábil o un enlazador lábil a enzimas.
12. La molécula de unión según la reivindicación 11, en donde el enlazador se selecciona 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), derivados bifuncionales de imidoésteres, ésteres activos, aldehídos, compuestos bis-azido, derivados de bis-diazonio, diisocianatos y compuestos de flúor bis-activos.
13. La molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para uso en el tratamiento del cáncer.
14. La molécula de unión para el uso de la reivindicación 13, en donde el cáncer es un cáncer hematológico o un cáncer epitelial o un cáncer del sistema nervioso central.

FIG. 1

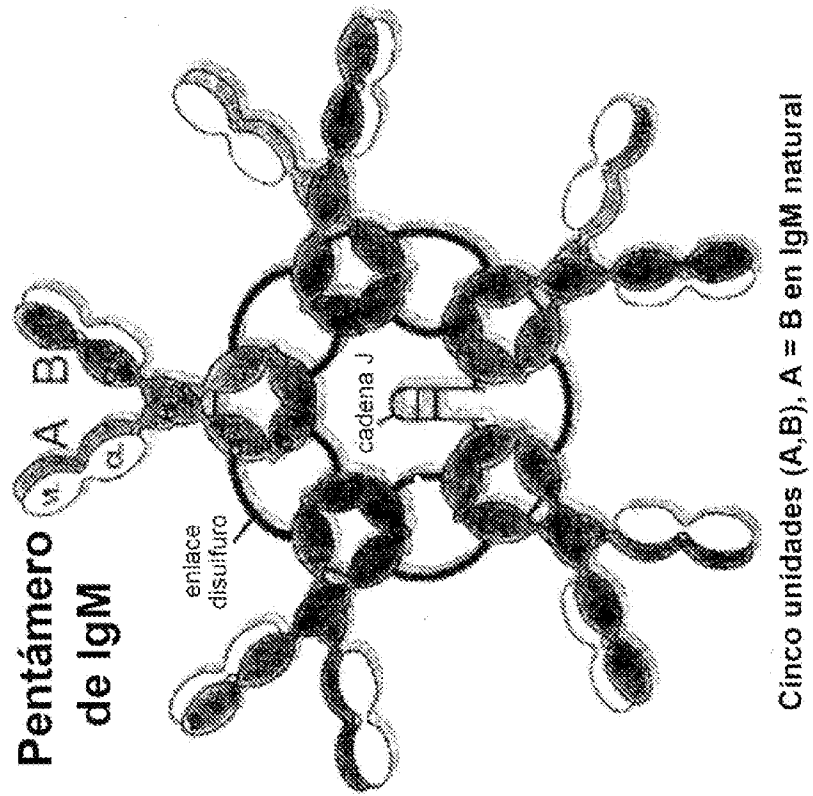


FIG. 2

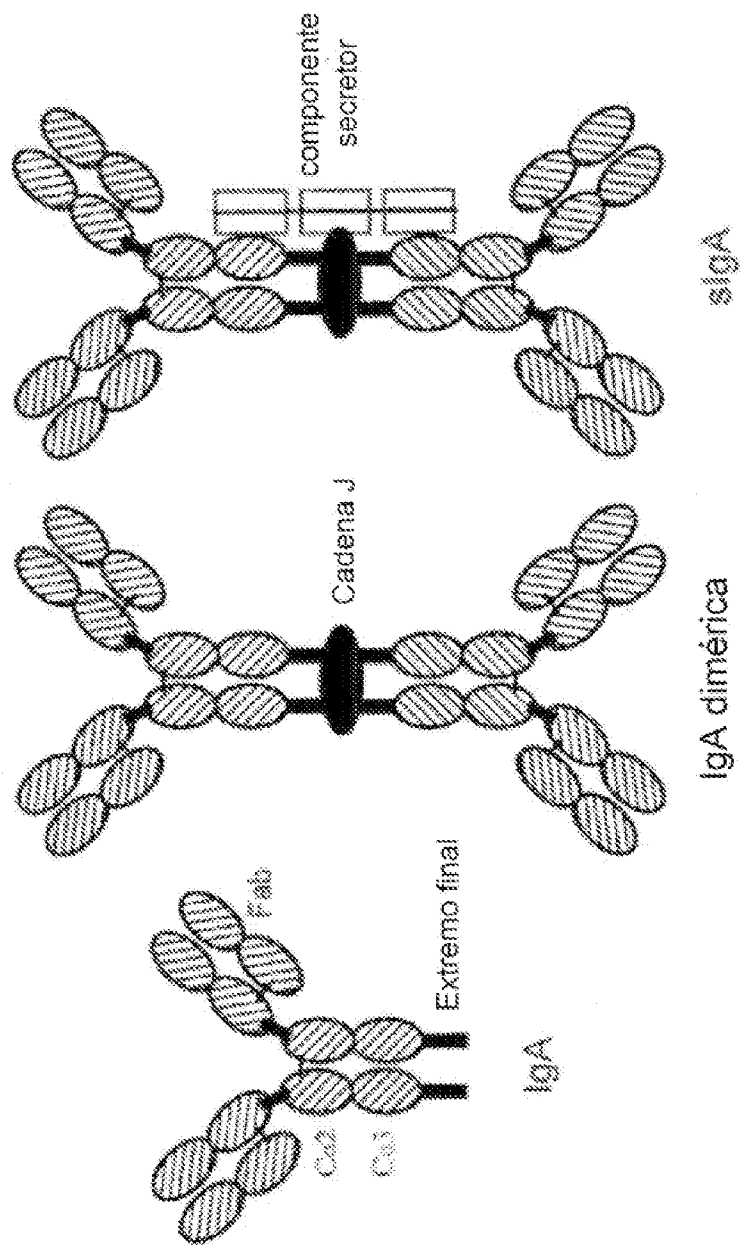


FIG. 3

Cadena J Humana Madura

* QEDERIVLDNKCKCARITSPRIRSSSEDPNEDIVERMI
RIIVPLNNRENISDPTSPLTRFRFVYHLSDLCKKCDPT
EVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCTTYDRNKCYT
AVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD (SEQ ID NO:
1)

- * Número de aminoácidos: 137
- * Peso molecular: 15594,4
- * pl teórico: 4,59

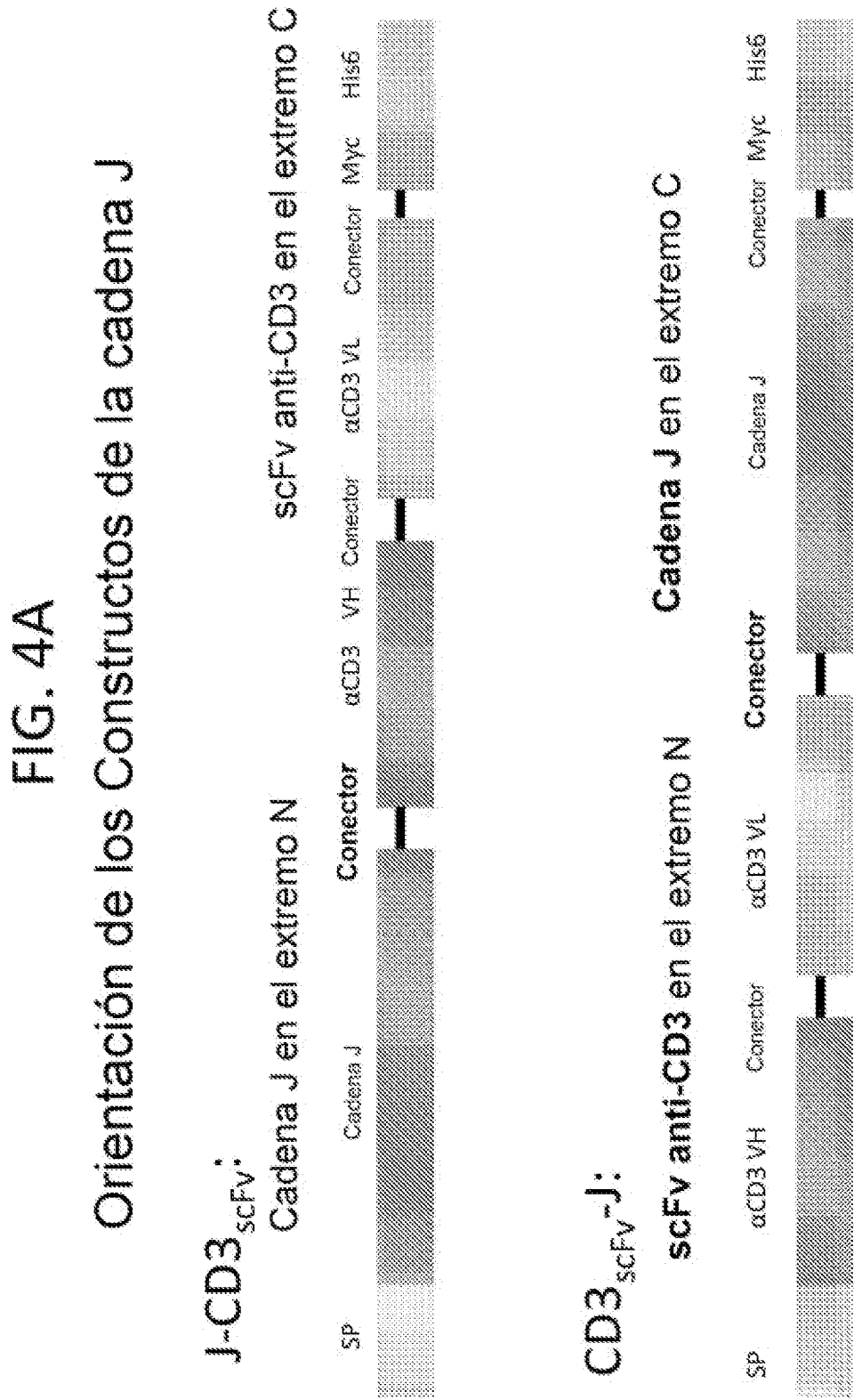
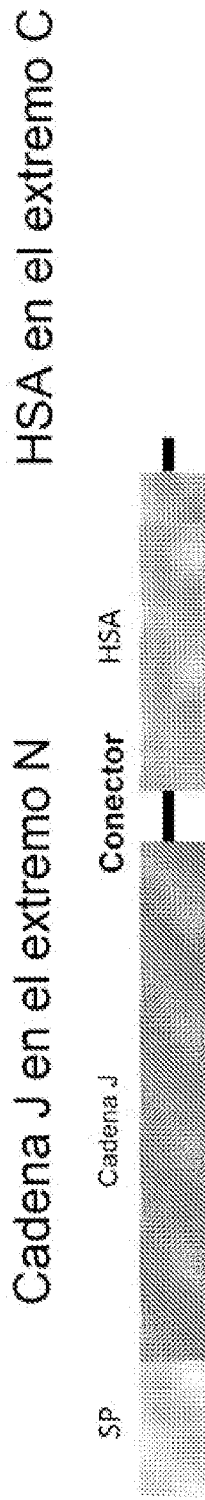


FIG. 4B

Orientación de los constructos de la cadena J

J-HSA:



HSA-J:

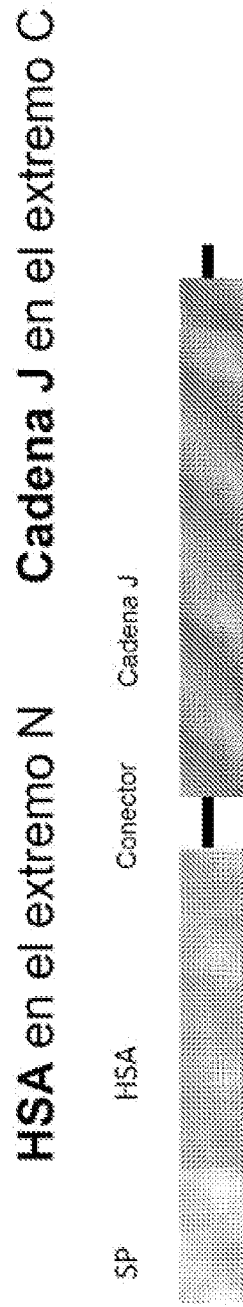


FIG. 5
Pentámero de IgM asimétrico con cadena J modificada

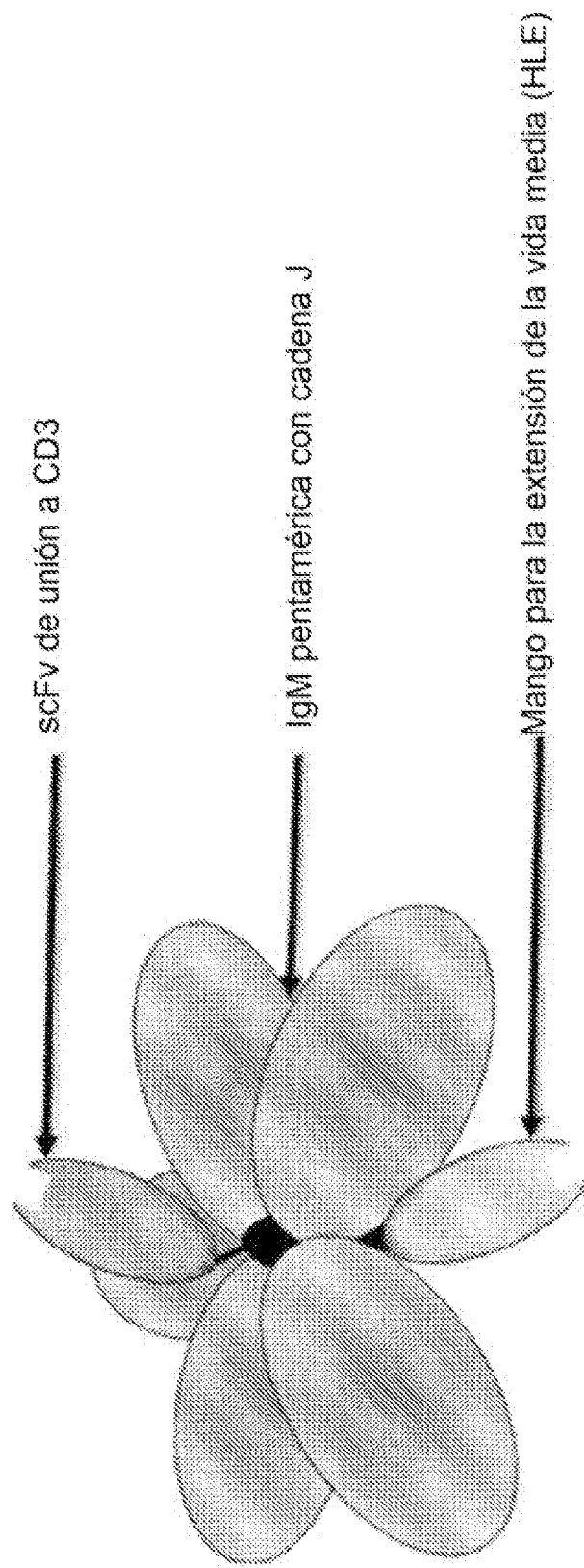


FIG. 6

Las IgM biespecíficas Anti-CD20_{IgM} x Anti-CD3_J pueden expresarse y montarse en un pentámero con diversos scFv en el extremo N o C de la cadena J

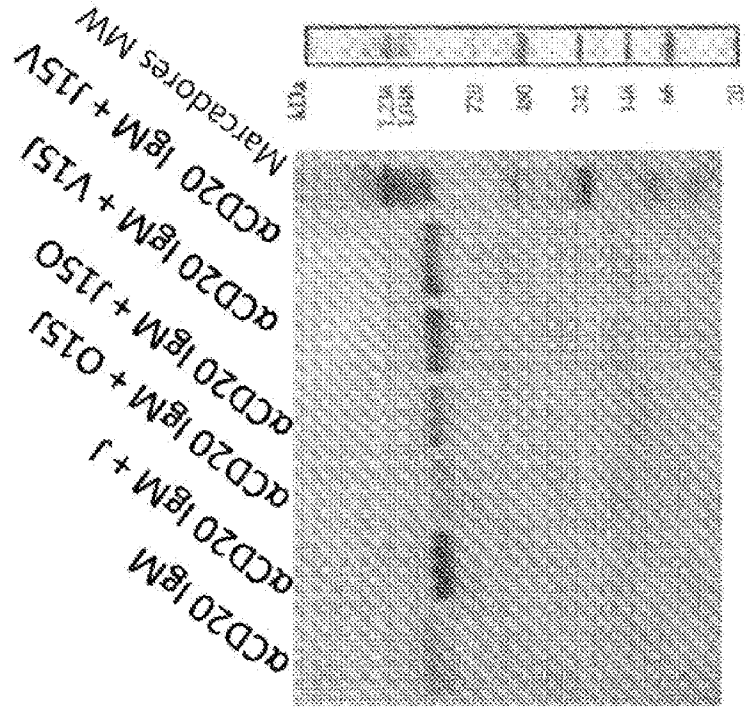
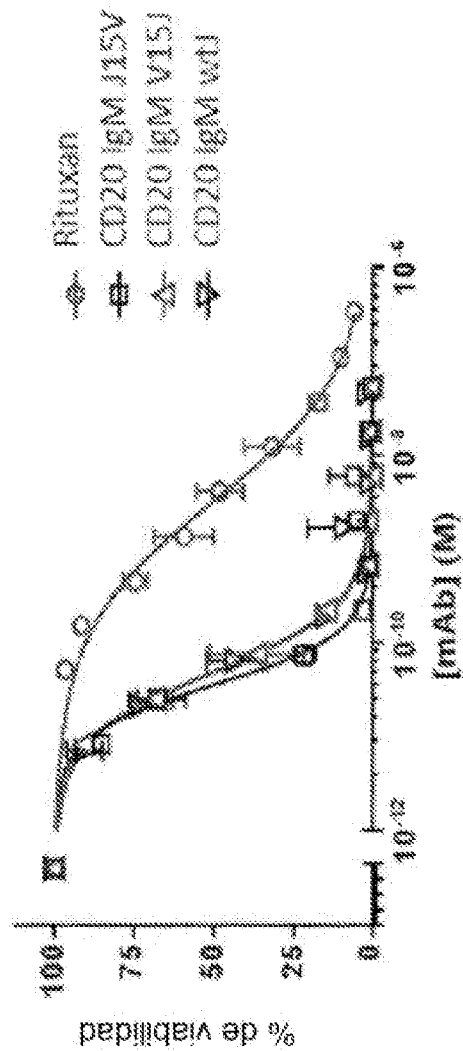


FIG. 7

IgM biespecíficas Anti-CD20_{IgM} x Anti-CD3_J con scFv Anti-CD3 en el extremo N o C de la cadena J: las IgM biespecíficas son funcionales en CDC



EC50 (nM)			
Rituxan	CD20 IgM J15V	CD20 IgM V15J	CD20 IgM wtJ
3,29	0,04	0,05	0,05

FIG. 8

La IgM biespecífica Anti-CD20_{IgM} x Anti-CD3_J induce la activación de células T en presencia de células diana

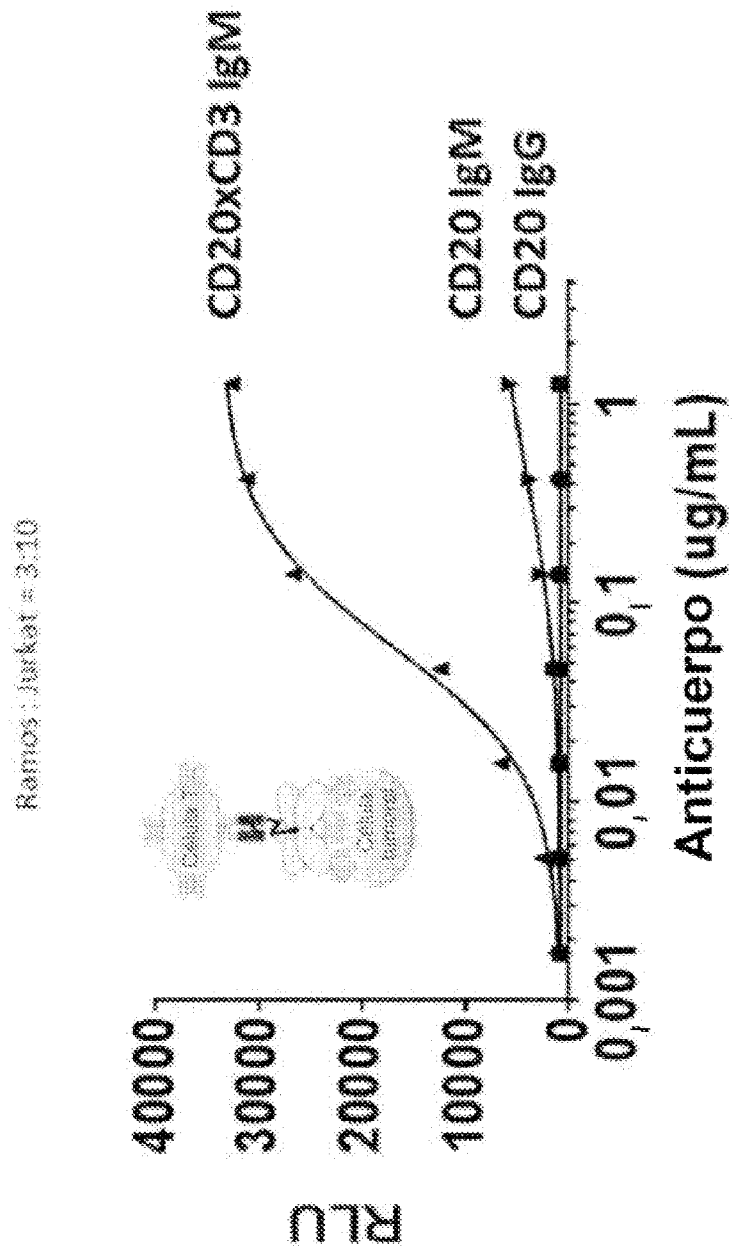


FIG. 9

IGM-55.5 tiene vida media in vivo reducida en ratones en ausencia de la extensión de la vida media

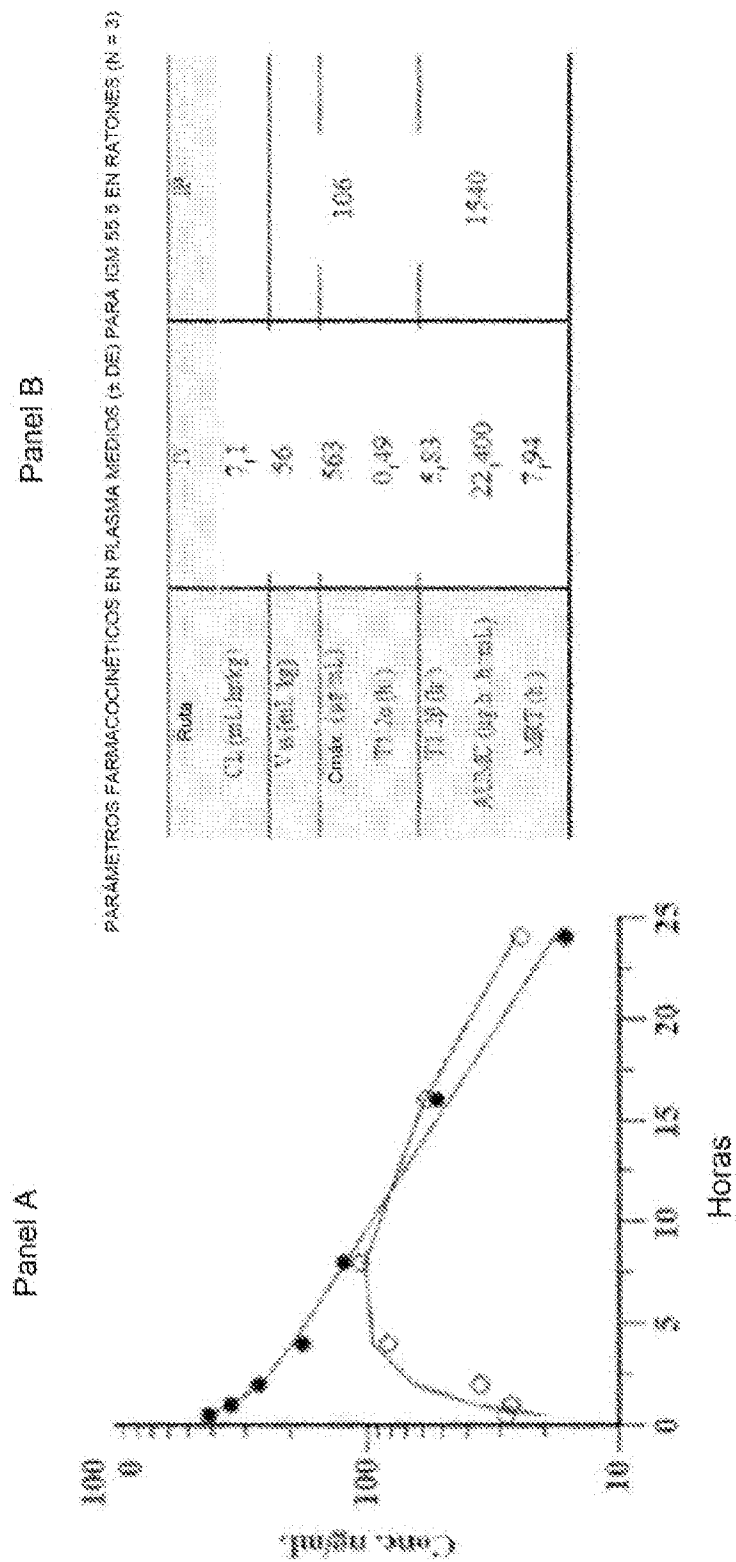


FIG. 10
ELISA específico de multímero para CD20 IgM

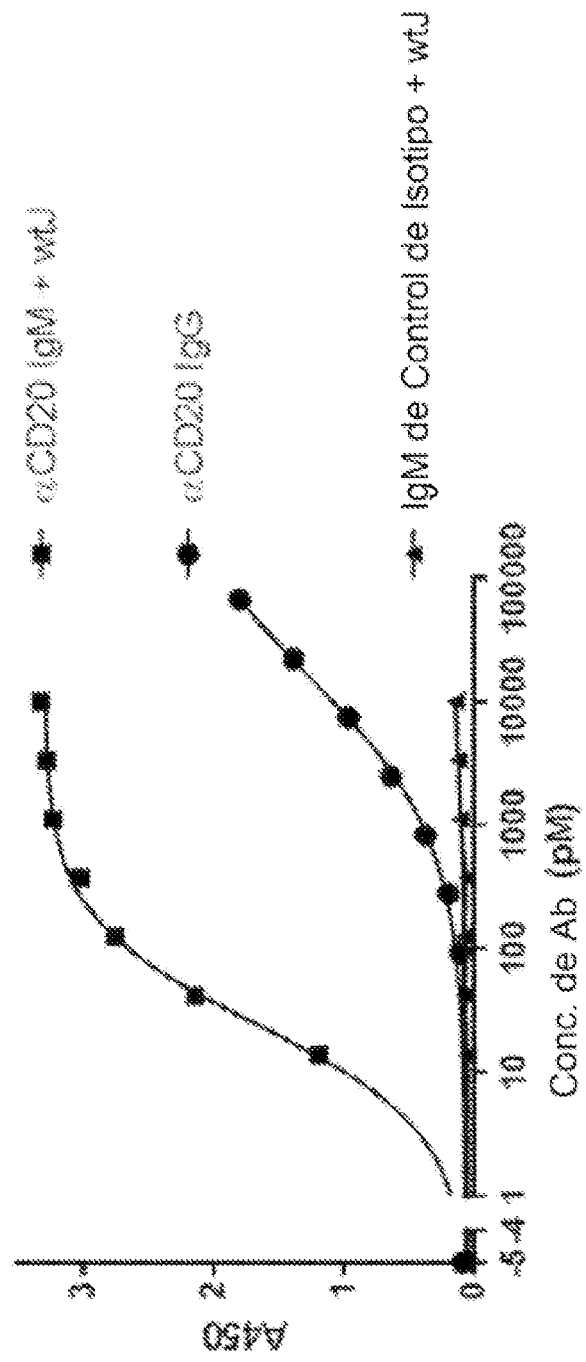
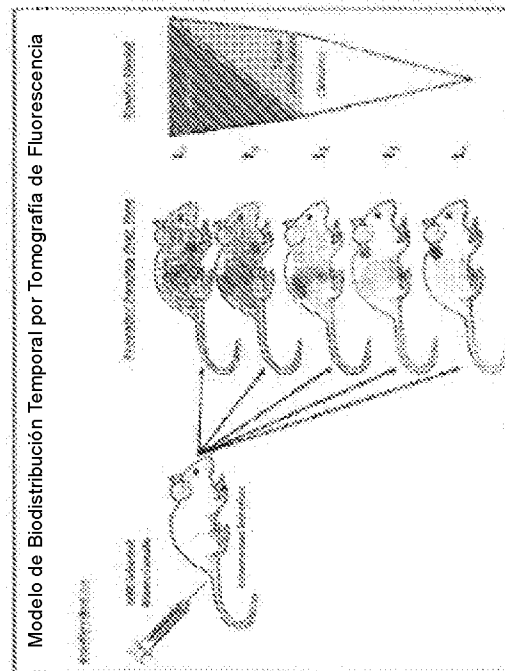


FIG. 11

Panel A



Panel B

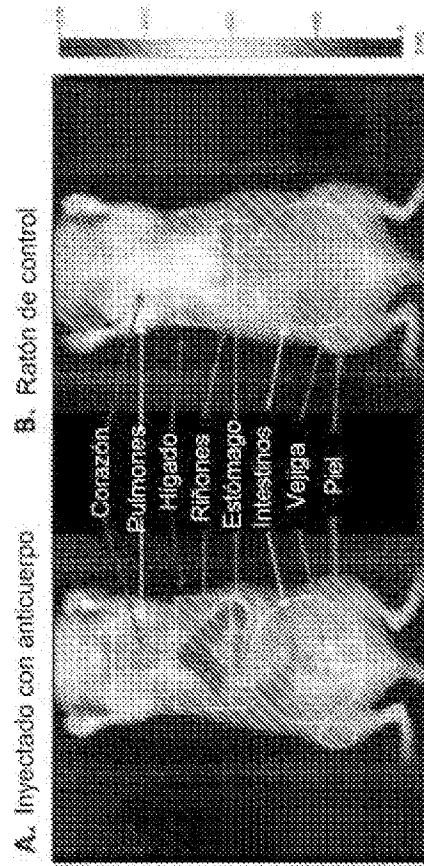


FIG. 12

Etiquetado específico en el sitio de glicanos de IgM
usando enfoques quimioenzimáticos

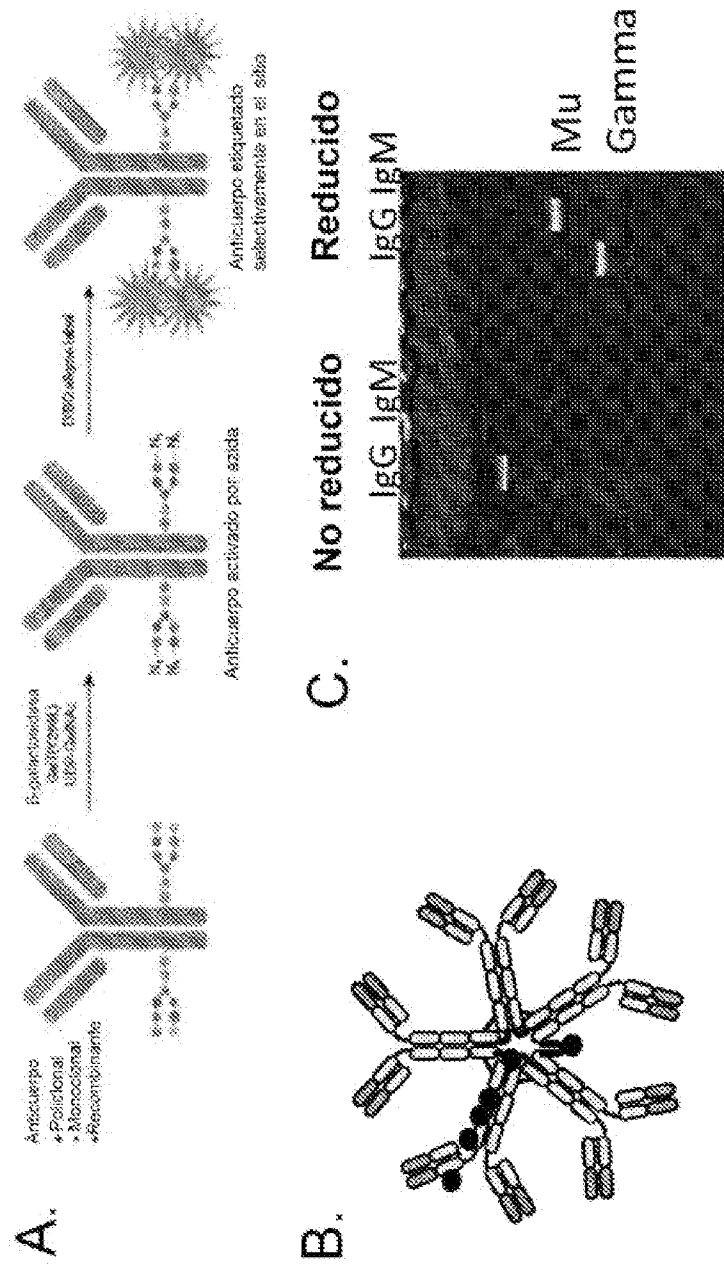


FIG. 13

Enfoque combinatorio para usos de compartimentalización de moléculas de unión a la cadena J

Diana de resto de unión a la cadena J

Dianas super agonistas: CD137 (4-1BB), OX40, CD40, GITR, CD27, HVEM
Dianas de bajo nivel de expresión: EGFR, HER2, HER3, EpCAM, CEACAM, Gp100, MAGE1
Dianas de baja afinidad: NY-ESO-1, antígeno de Sialli Lewis X, antígeno Tn
Dianas de cáncer hematológico: CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52, CD70
Otras dianas de unión: VEGF, TNF alfa, amiloide beta, BACE

Dianas para regular la vida media Albumina sérica humana (HSA) Péptidos de unión a HSA Receptor de Fc neonatal (FcRn) Dominio Fc
Dianas para regular la bio-distribución Transferrina, receptor de transferrina (TfR) Insulina, receptor de insulina IGF-1, receptor de IGF-1 Leptina, receptor de leptina basigina Glut1 CD98hc
Diana para la retención en compartimentos intraoculares o intraarticulares Ácido hialurónico TSG-6

FIG. 14

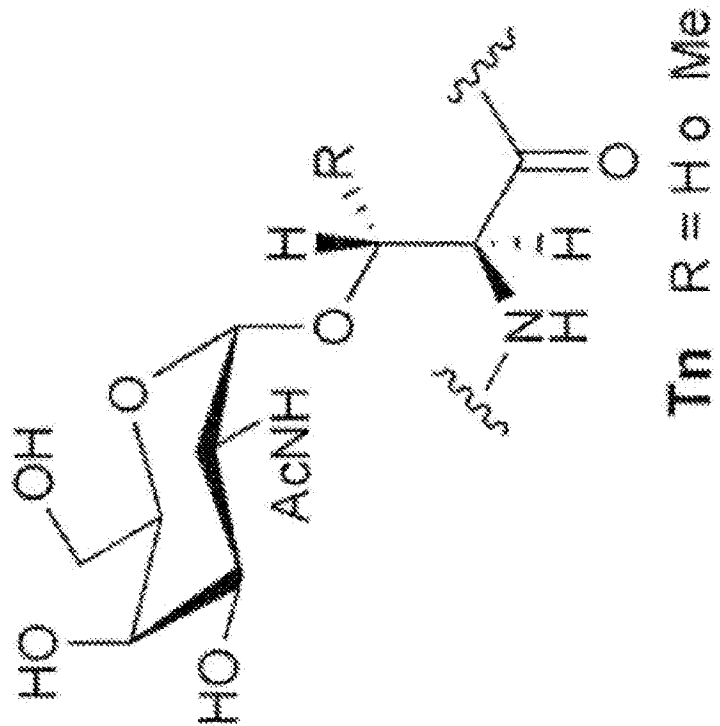
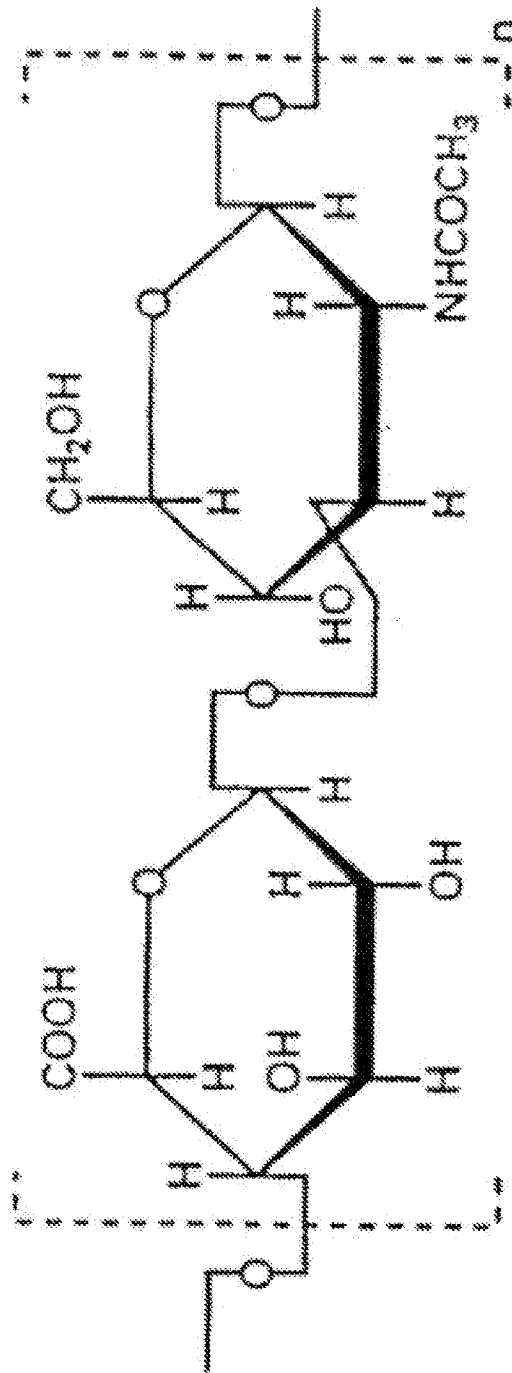


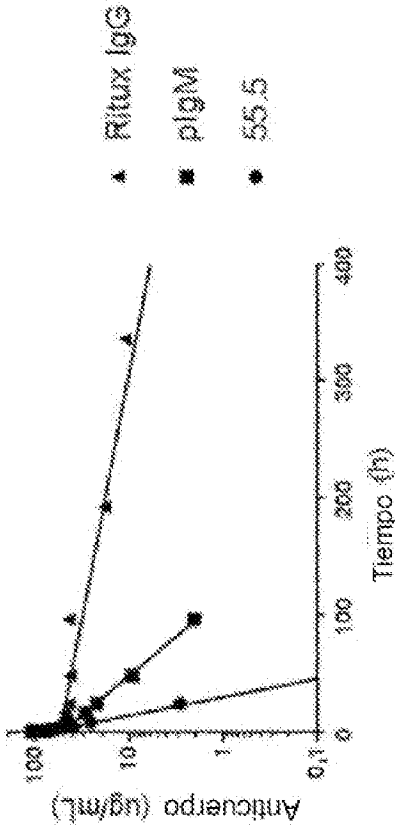
FIG. 15



Unidades alternas de N-acetilglucosamina
y ácido glucurónico unidas en 1,4

FIG. 16

Panel A:

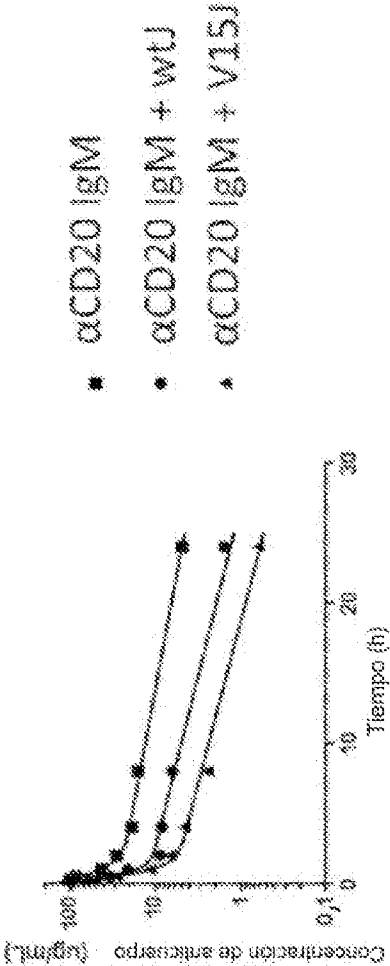


Panel B:

Anticuerpo	$t_{1/2 \alpha}$ (h)	$t_{1/2 \beta}$ (h)	ABC _{0-∞} ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)
Rituximab	2,4	158,7	12180
IgM policlonal	0,99	14,3	1412
55.5 (CHO IgM)	0,2	4,7	549

FIG. 17

Panel A:

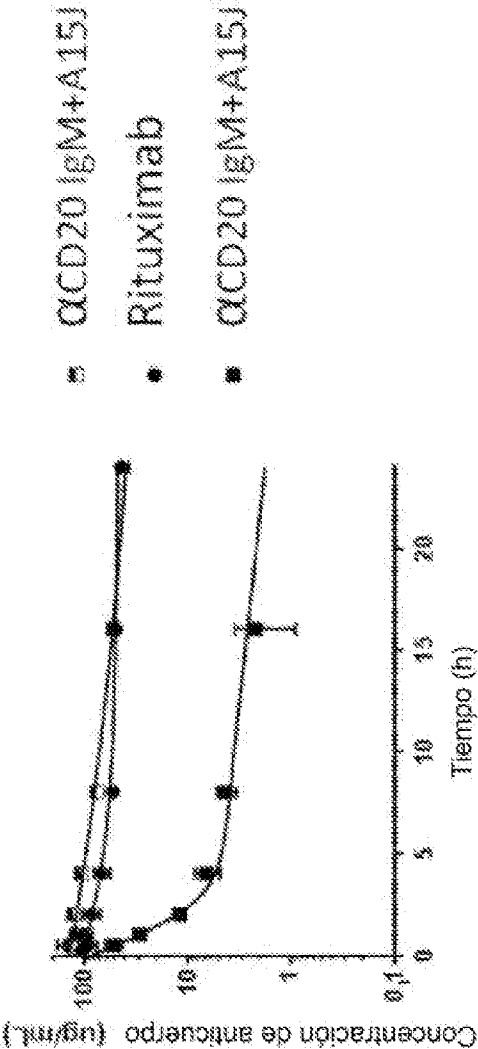


Panel B:

Anticuerpo	$t_{1/2} \alpha$ (h)	$t_{1/2} \beta$ (h)	ABC _{0-∞} (µg/ml* h)
αCD20 IgM	0,38	9,8	477
αCD20 IgM + wtJ	0,24	7,3	169
αCD20 IgM + V15J	0,23	4,0	82

FIG. 18

Panel A:



Panel B:

Anticuerpo	$t_{1/2} \alpha$ (h)	$t_{1/2} \beta$ (h)	$ABC^{(0-\infty)}$ (µg/ml*h)
Rituximab	2,4	158,7	12180
αCD20 IgM+V15J	0,23	4,0	82
αCD20 IgM+A15J	3,2	32,4	1341

FIG. 19

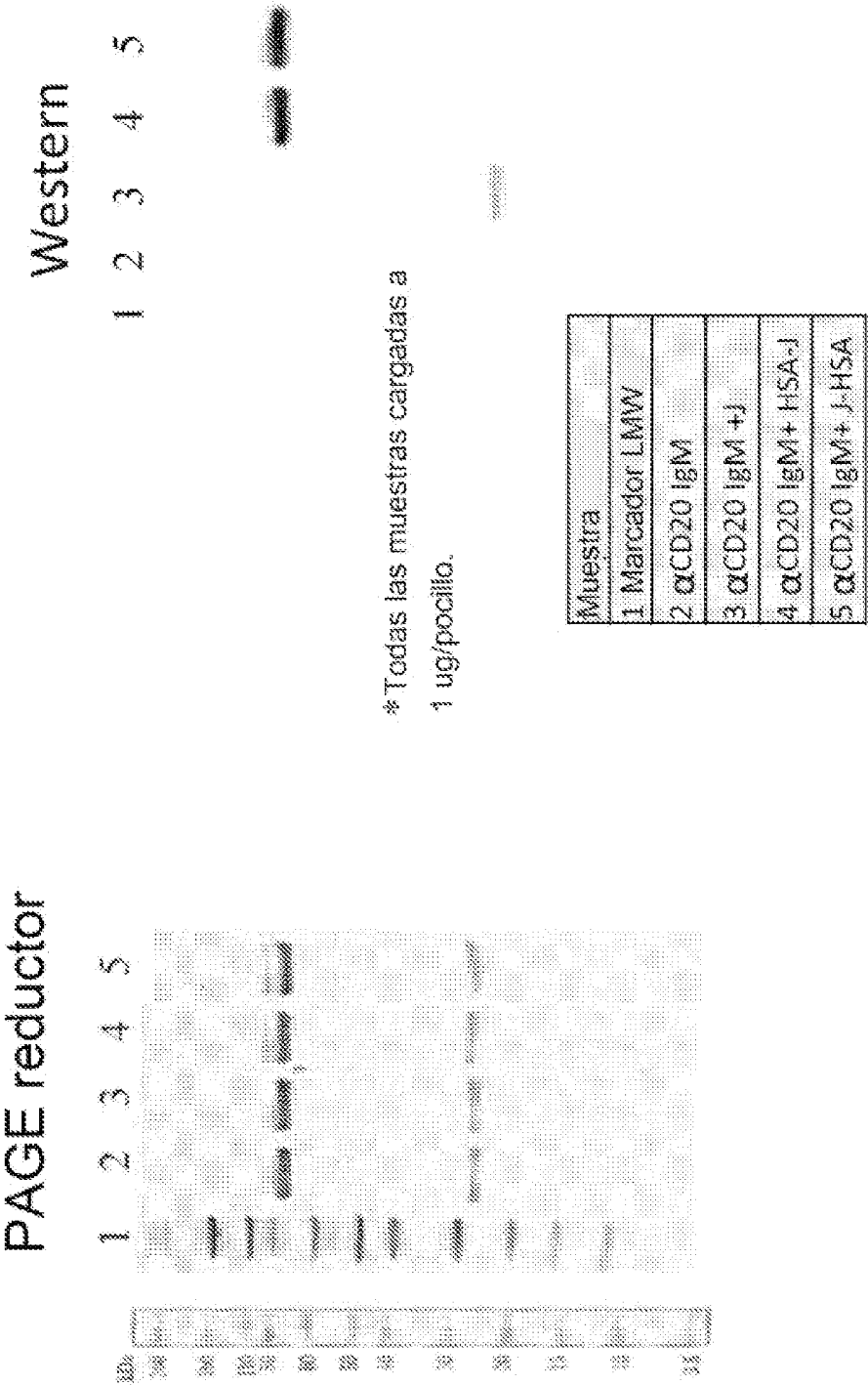


FIG. 20

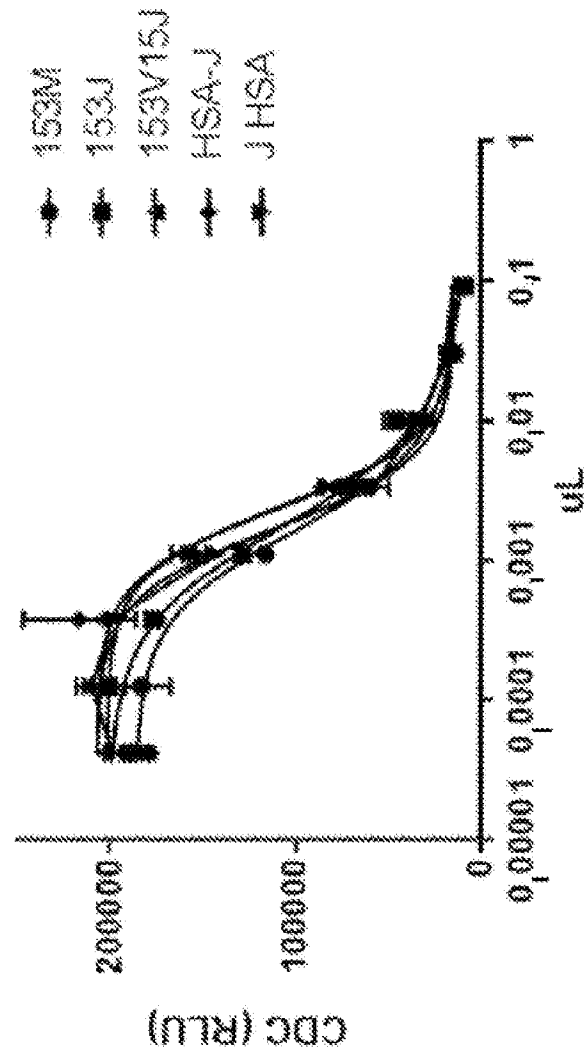


FIG. 21

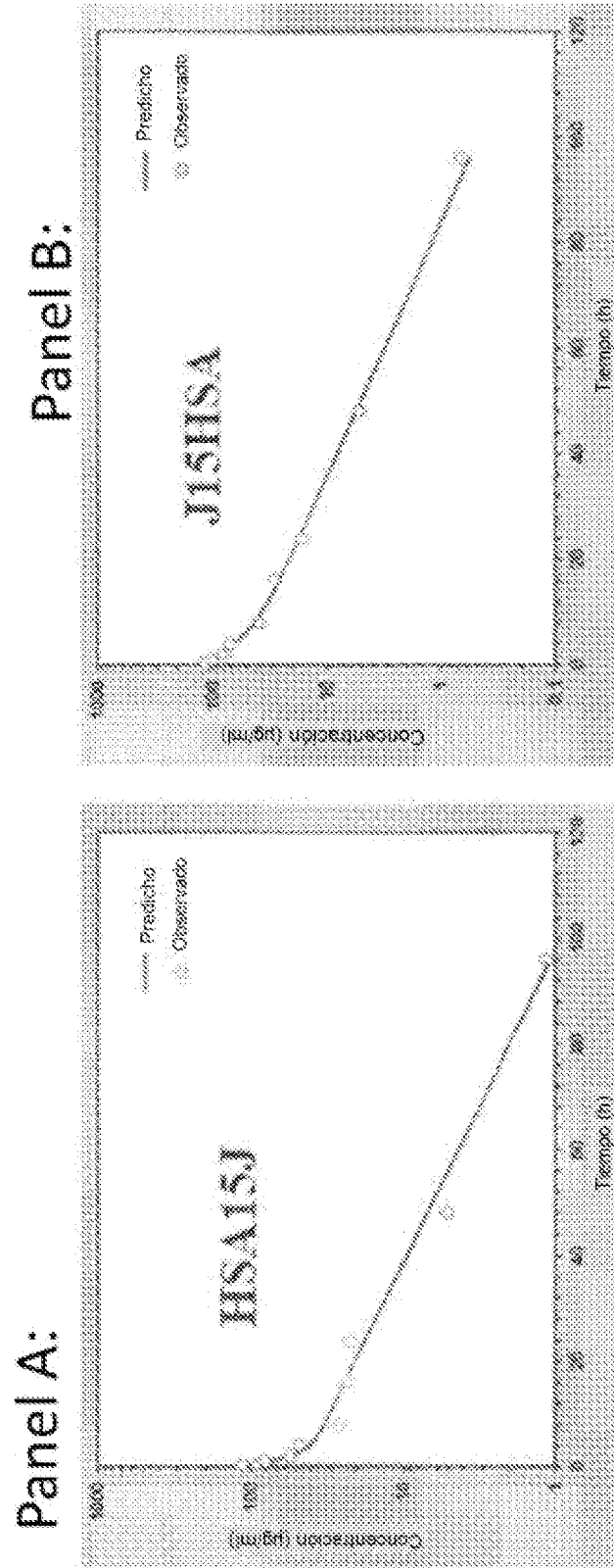


FIG. 22

Anticuerpo	$t_{1/2} \alpha$ (h)	$t_{1/2} \beta$ (h)	$ABC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}^*$ h)
Rituximab	2,4	158,7	12180
1.5.3 IgM+V15J	0,23	4,0	82
1.5.3 IgM+J15A	3,2	32,4	1341
1.5.3 IgM+A15J	0,85	10,3	1196
1.5.3 IgM+J15H	2,3	14,5	1380
1.5.3 IgM+H15J	0,71	17,7	1259

FIG. 23

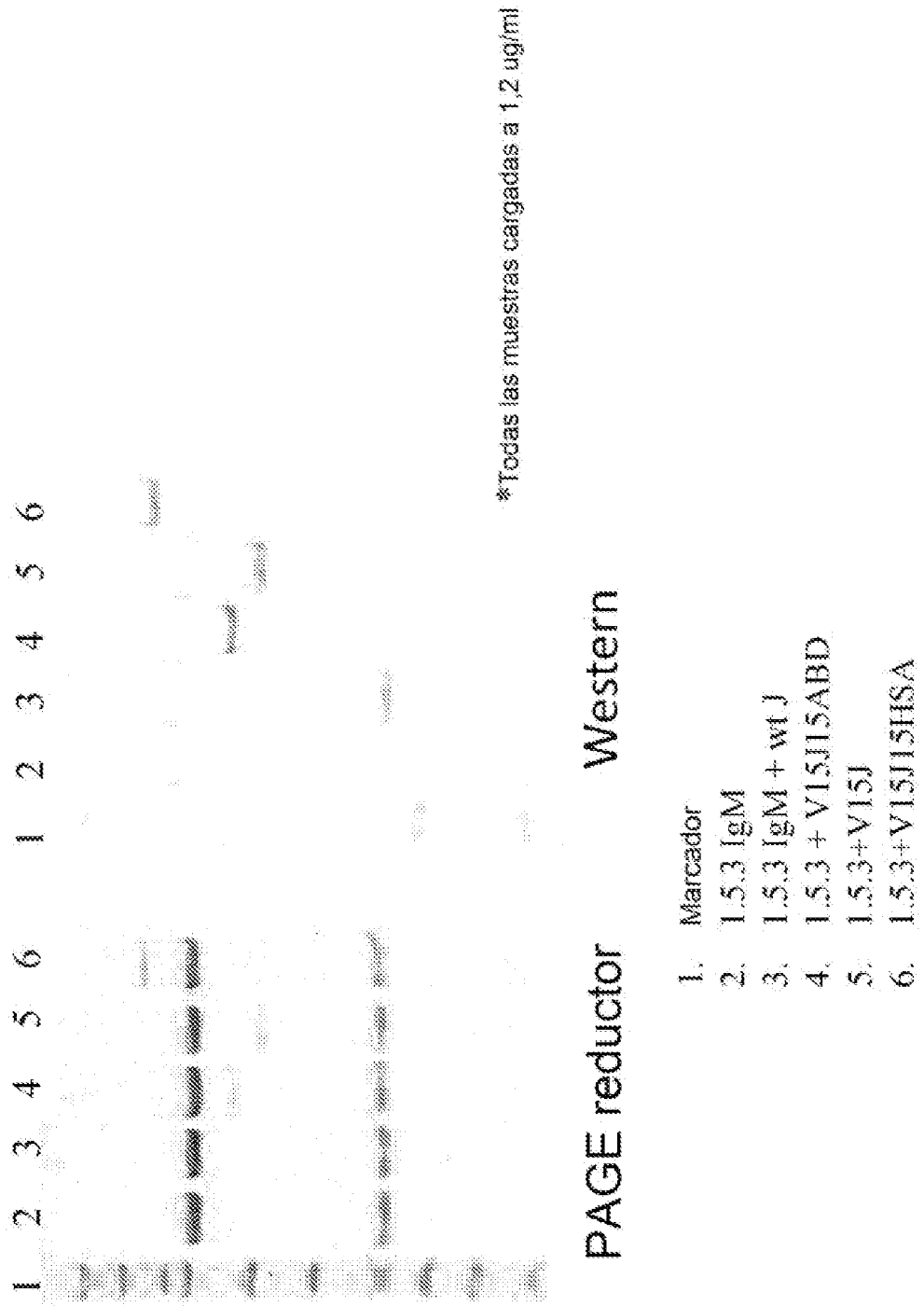


FIG. 24

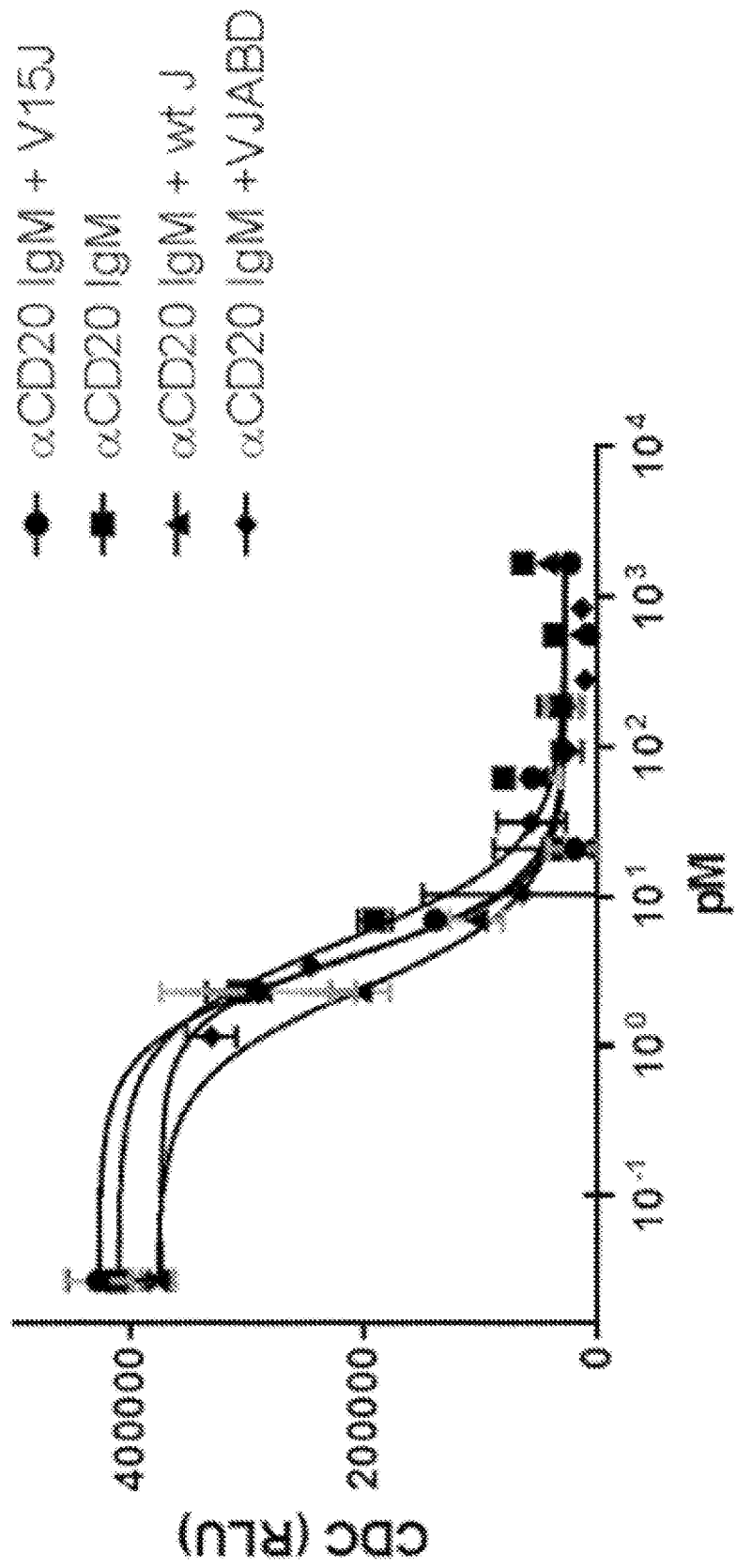


FIG. 25

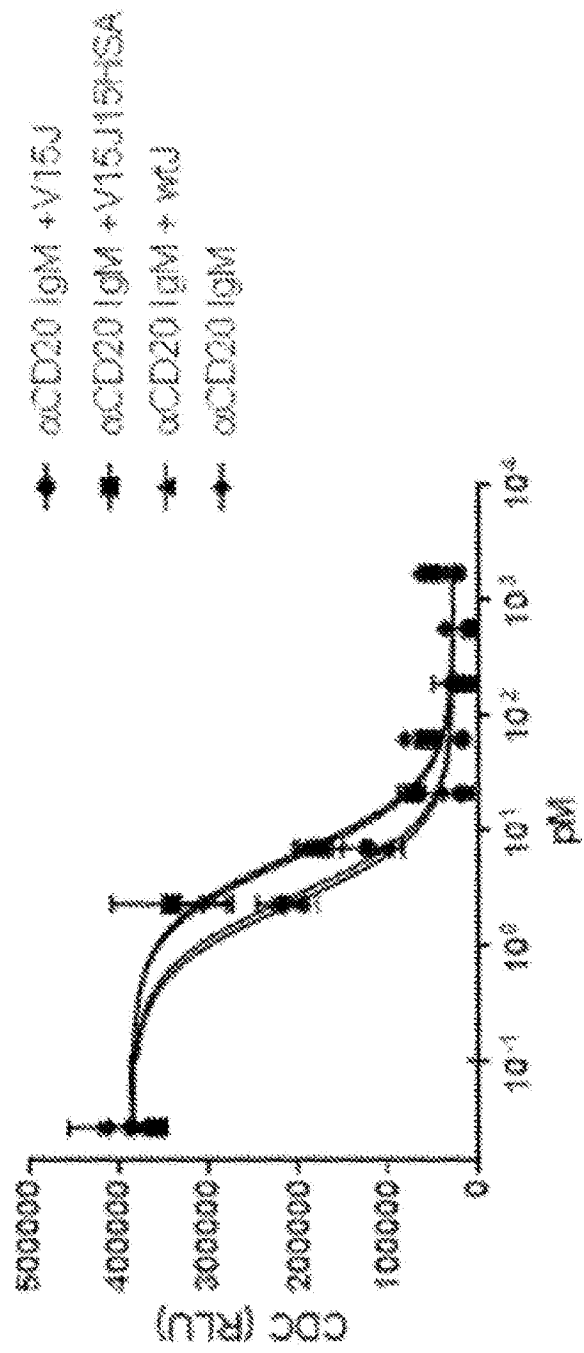


FIG. 26

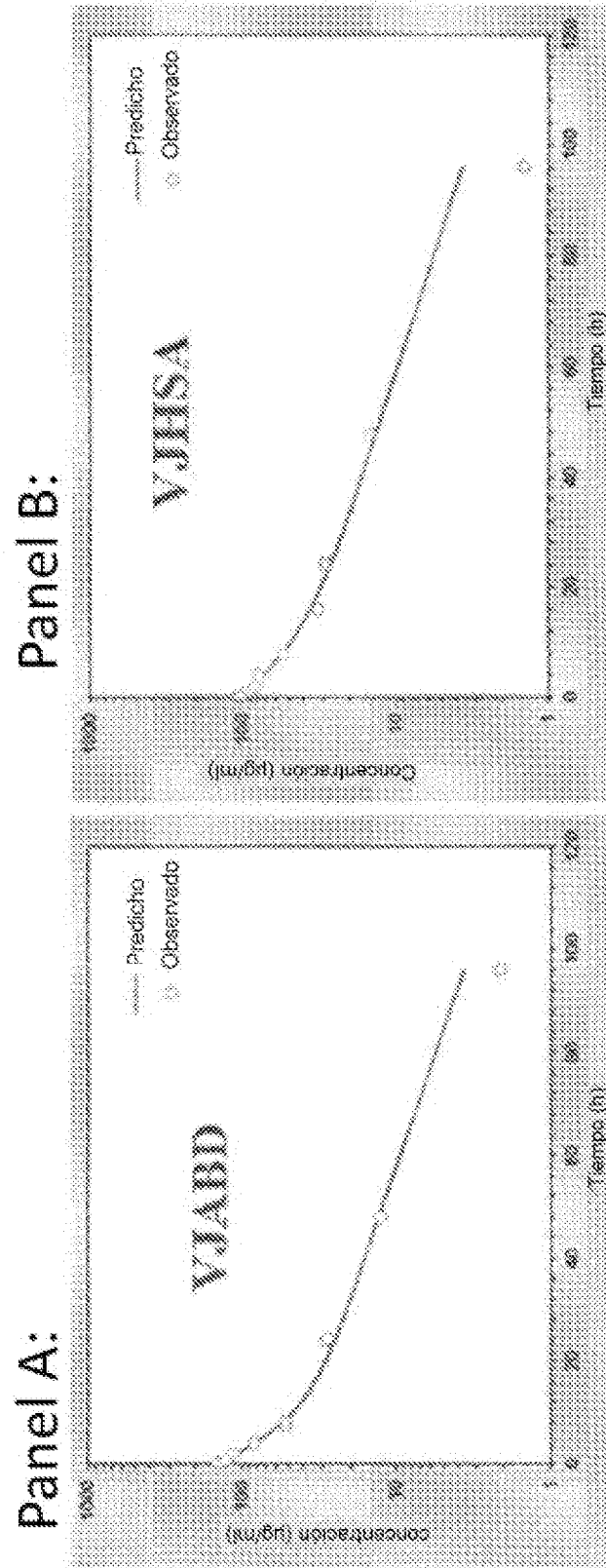


FIG. 27

	$t_{1/2}$ Alfa	$t_{1/2}$ Beta	ABC	p-inf
153 IgM HSAJ	0,78	17,8		1260
153 IgM JHSA	2,33	14,5		1380
153 IgM VJABD	3,22	26,0		2212
153 IgM VJHSA	4,22	25,6		2167

FIG. 28

