

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 870**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2016** **PCT/US2016/055053**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017** **WO17059387**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2016** **E 16784322 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020** **EP 3356401**

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

30 Prioridad:

30.09.2015 US 201562235486 P

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

19.04.2021

73 Titular/es:

IGM BIOSCIENCES, INC. (100.0%)

**325 E. Middlefield Rd.
Mountain View, CA 94043, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 819 870 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 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la fecha de presentación de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 62/235.486, depositada el 30 de septiembre de 2015.

10 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a moléculas de unión que comprenden un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA con una cadena J modificada para incluir un resto de unión que afecta a una vía de señalización de las células T, y sus usos.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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 implican el penúltimo residuo de cisteína en la pieza de cola (pc) de secreción de 18 aminoácidos en el extremo C-terminal de la cadena pesada de 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 y col. 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 y col. 2000, Int. Immunol. 12(1): 19-27 y Yoo y col. 1999, J. Biol. Chem. 274(47):33771-33777, respectivamente. La producción recombinante de cadena J soluble en E coli es notificada por Redwan y col. 2006, Human Antibodies 15:95-102

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 y col. 2001, Clin Immunol 101(1):21-31. Se ha notificado que la adición de otp o utp al final de la cadena pesada de IgG y facilita la polimerización y aumenta la función efectora tal como la activación del complemento (Smith y col., J Immunol 1995, 154:2226-2236). Los anticuerpos de IgA/IgG híbridos 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, y col., High level expression of functional human IgMs in human PER.C6 cells. mAbs. 2009;1(2): 163-171. El documento WO2004110143 describe proféticamente biocidas unidos a la cadena J de IgA.

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

40

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 construcciones 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 esta estrategia biespecífica es "blinatumomab" (MT103 o AMG103) que une los receptores CD3 y CD19 en células T y B, respectivamente. Esta inmovilización de una célula T citotóxica a una célula B cancerosa permite el tratamiento efectivo 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 inhibidora 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. y col., "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 los modelos preclínicos, los investigadores han

notificado que los anticuerpos bloqueadores de IgG monoclonales dirigidos contra los componentes de la vía de señalización inhibitoria de células T (por ejemplo, ipilimumab (Bristol-Myers Squibb) y tremelimumab (MedImmune/AstraZenica), ambos dirigidos contra CTLA4) solo han logrado resultados de eficacia mínimos en un entorno clínico. *Por ejemplo*, Postow y col., págs. 1-2. Además, los tratamientos que involucran anticuerpos monoclonales de IgG han resultado en eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario, como eventos dermatológicos, gastrointestinales, hepáticos, endocrinos y otros eventos inflamatorios. *Por ejemplo*, *Id. en la p. 4*. Como tal, el uso de anticuerpos monoclonales de IgG en el bloqueo de puntos de regulación del sistema inmunitario puede estar limitado por el índice terapéutico de tales moléculas, en el sentido de que la dosis de un anticuerpo monoclonal de IgG requerida para provocar el efecto terapéutico deseado también causa eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario.

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.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La materia objeto de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

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

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 cuestión permite la unión entre números específicos y/o tipos específicos de dianas de unión, lo que facilita la unión entre combinaciones específicas de dianas de antígeno. La porción de la cadena J modificada de las moléculas de unión en cuestión proporciona oportunidades adicionales para la unión de la diana, lo que permite que las moléculas de unión en cuestión se unan a una o más dianas a través de la porción de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA de la molécula, mientras que simultáneamente se une a una o más dianas mediante un resto de unión en la cadena J.

Los aspectos de la invención incluyen moléculas de unión que comprenden un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA con una cadena J modificada, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, donde la cadena J modificada comprende un resto de unión que afecta a una vía de señalización de células T. En algunas realizaciones, un resto de unión antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T. En algunas realizaciones, un resto de unión en la cadena J modificada se une a una proteína de la superficie celular seleccionada de entre el grupo que consiste en: CTLA4, PD-1, TIM3, LAG3, BTLA, VISTA y TIGIT. En algunas realizaciones, el anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a una diana seleccionada de entre el grupo que consiste en: PD-1, PD-L1, TIM3 y LAG3.

En algunas realizaciones, un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA agoniza una vía de señalización estimuladora de células T. En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en: CD137, OX40, CD40, GITR, CD27 y HVEM. En algunas realizaciones, el anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a una diana de expresión de bajo nivel. En algunas realizaciones, la diana de expresión de bajo nivel se selecciona de entre el grupo que consiste en: EGFR, HER2, HER3, EpCAM, CEACAM, Gp100, MAGE1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la diana de expresión de bajo nivel es una proteína de la superficie celular en una célula cancerosa epitelial.

En algunas realizaciones, un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a una diana de baja afinidad. En algunas realizaciones, la diana de baja afinidad se selecciona de entre el grupo que consiste en: NY-ESO-1, antígeno Sialyl Lewis X y antígeno Tn. En algunas realizaciones, la diana de baja afinidad es una proteína de la superficie celular en una célula cancerosa epitelial. En algunas realizaciones, la diana de anticuerpo es una proteína de la superficie celular en una célula cancerosa hematológica. En algunas realizaciones, la diana de anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en: CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52 y CD70.

En algunas realizaciones, una cadena J modificada comprende una secuencia de cadena J humana modificada. En algunas realizaciones, la secuencia de cadena J humana modificada comprende la secuencia de cadena J humana

nativa de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto de unión de cadena J se introduce en la secuencia de cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 por fusión directa o indirecta. En algunas realizaciones, el resto de unión se introduce mediante fusión indirecta a través de un enlazador peptídico. En algunas realizaciones, la fusión indirecta se logra a través de un enlazador peptídico en o alrededor del extremo C- y/o N-terminal del resto de unión. En algunas realizaciones, el resto de unión se introduce en la secuencia de cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 en o alrededor del extremo C-terminal. En algunas realizaciones, el resto de unión se introduce en la secuencia de cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 dentro de alrededor de 10 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal. En algunas realizaciones, el resto de unión se introduce en la secuencia de cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 en o alrededor del extremo N-terminal. En algunas realizaciones, el resto de unión se introduce en la secuencia de cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 dentro de alrededor de 10 residuos de aminoácidos del extremo N-terminal. En algunas realizaciones, el resto de unión se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa entre los residuos de cisteína 92 y 101 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto de unión se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 en o cerca de un sitio de glicosilación. En una algunas realizaciones, el enlazador peptídico tiene alrededor de 10 a 20 aminoácidos de longitud. En una algunas realizaciones, el enlazador peptídico tiene alrededor de 15 a 20 aminoácidos de longitud. En una algunas realizaciones, el enlazador peptídico tiene 15 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones, el resto de unión se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 mediante derivatización química o quimioenzimática. En algunas realizaciones, el resto de unión se introduce en la secuencia de cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 mediante un enlazador químico. En algunas realizaciones, el enlazador químico es un enlazador escindible o no escindible. En algunas realizaciones, el enlazador escindible es un enlazador químicamente lábil o un enlazador enzimáticamente lábil. 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. En algunas realizaciones, la cadena J modificada se modifica mediante la inserción de un sitio de reconocimiento de enzima, y mediante la unión postraducciona de un resto de unión en el sitio de reconocimiento de enzima a través de un enlazador peptídico o no peptídico.

En algunas realizaciones, un resto de unión se selecciona de entre el grupo que consiste en: anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno y conjugados de anticuerpo-fármaco. En algunas realizaciones, el resto de unión es un fragmento de unión al antígeno y se selecciona de entre el grupo que consiste en: $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$, y un anticuerpo de dominio único. En algunas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno es $scFv$.

En algunas realizaciones, la cadena J modificada está en una orientación V-enlazador-J. En algunas realizaciones, la cadena J modificada está en una orientación J-enlazador-V. En algunas realizaciones, el anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA es un anticuerpo biespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA es un anticuerpo multiespecífico.

Los aspectos de la invención incluyen composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer, donde la composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de una molécula de unión y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los aspectos de la invención incluyen sse de una molécula de unión en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer hematológico o un cáncer epitelial. En algunas realizaciones, el cáncer hematológico es una leucemia, linfoma, mieloma o síndrome mielodisplásico. En algunas realizaciones, la leucemia es una leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena crónica, o leucemia linfocítica crónica. En algunas realizaciones, el linfoma es linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin. En algunas realizaciones, el cáncer epitelial es un melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, nasofaríngeo, colorrectal, de hígado, de vejiga urinaria, de ovario, gástrico, esofágico, pancreático, renal, de tiroides o de mama. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama triple con receptores hormonales negativos o triple negativo.

En algunas realizaciones, el medicamento comprende además una cantidad efectiva de un segundo agente terapéutico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

La figura 2 muestra las estructuras esquemáticas de IgA, IgA dimérica e IgA de secreción (sIgA).

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

La figura 4 es una ilustración de la estructura del antígeno Tn.

- 5 La figura 5 es una ilustración esquemática de dos orientaciones diferentes de construcciones de cadena J que comprenden una cadena J modificada con un resto de unión que se une a CTLA4.

La figura 6 es una ilustración esquemática de un pentámero de IgM asimétrica con especificidad de unión para un antígeno diana y que comprende un resto de unión unido a la cadena J.

10

La figura 7 enumera dianas de anticuerpos de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA y dianas para un resto de unión en una cadena J. Cualquiera de las dianas de anticuerpos enumeradas en la columna de la izquierda se puede combinar con cualquiera de las dianas para un resto de unión en una cadena J enumeradas en la columna de la derecha.

- 15 La figura 8 muestra un análisis de SDS PAGE híbrido e inmunoelectrotransferencia de varios anticuerpos IgM anti-PD-L1 con un resto de unión anti-CTLA4 unido a la cadena J. El ensamblaje apropiado de la IgM pentamérica de unión a PD-L1 en presencia de una cadena J con o sin scFv anti-CTLA-4 da como resultado una mayor cantidad de producto ensamblado y un cambio de movilidad del gel.

- 20 La figura 9, el panel A muestra un análisis SDS PAGE de anticuerpos IgM anti-CD20 con o sin varios restos de unión a anti-CD3 en la cadena J. El panel B es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de activación de células T que compara la capacidad de una IgM anti-CD20 con un resto de unión a CD3 en la cadena J para activar las células T, en comparación con los anticuerpos IgM anti-CD20 sin un resto de unión a CD3 en la cadena J, así como anticuerpos IgG anti-CD20.

25

La figura 10 muestra dos gráficos que comparan la unión de moléculas IgM anti-PD-L1 e IgG anti-PD-L1 en dos tipos de células diferentes que tienen niveles altos y bajos de expresión de PD-L1.

- 30 La figura 11 muestra un gráfico que compara la inhibición de la interacción PD-1:PD-L1 por moléculas de IgM e IgG elaboradas con secuencias VH del anticuerpo anti-PD-L1 S70.

La figura 12, el panel A muestra un gel híbrido de SDS PAGE de IgM S70 con la cadena J fusionada con scFv de tipo salvaje o de unión a CD3. El panel B es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de bloqueo de la interacción PD-1:PD-L1 que muestra que la cadena J de unión a CD3 no interrumpe la unión de PD-L1 y el bloqueo

35

La figura 13 es un gráfico que muestra la activación de células T por IgM S70 que lleva la cadena J de unión a CD3 o ts en una línea celular que expresa PD-L1, con y sin estimulación adicional con interferón gamma para aumentar la expresión de PD-L1.

40

La figura 14 es un gráfico que muestra la muerte de células diana dependientes de células T con células que expresan PD-L1 baja (HDML2) y alta (SUPHD).

- 45 La figura 15, el panel A muestra un gel híbrido de SDS PAGE que demuestra la expresión y el ensamblaje de IgM S70 en presencia de scFv de tipo salvaje, de unión a CD3 (V) o anti-CTLA-4 (Y). El panel B es un gráfico que demuestra el bloqueo de la interacción de PD-1:PD-L1 con cada uno de estos anticuerpos.

La figura 16, el panel A muestra un gel híbrido de IgM anti-PD-L1 con y sin cadena J ts, así como con dos cadenas J modificadas que llevan un scFv anti-CTLA-4 (Y) o un scFv anti-CD3 (V).

50

La figura 17 muestra dos gráficos que muestran la cinética de unión de IgM S70 que lleva la cadena J de unión a CTLA-4 o la IgG de unión anti-CTLA-4 parental, utilizando la lectura Forte Bio BLI. El anticuerpo de unión a CTLA-4 (IgG) parental se une con una Kd de 2 nM frente a la unión monovalente del S70 Y15J.

- 55 La figura 18 es una ilustración esquemática que compara la capacidad del ligando TRAIL, anticuerpos de IgG e IgM para miembros diana de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF).

La figura 19 es un gráfico que compara la actividad agonista de anticuerpos de IgM e IgG anti-DR5.

- 60 **Descripción detallada de la invención**

I. Definiciones

Antes de describir la presente invención con mayor detalle, se debe comprender que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que estas evidentemente pueden variar. También debe comprenderse que la terminología utilizada en esta invención tiene el fin de describir solamente realizaciones particulares y no pretende ser
5 limitativa, dado que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

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
10 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.

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 y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994), proporciona un experto en la materia con una guía general a muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), moléculas de cadena simple, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, y Fv). El término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza de manera intercambiable con "anticuerpo" en esta invención. La unidad básica de anticuerpos 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
20 "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 enlazada a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están enlazadas 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
30 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
40 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 mayormente como un pentámero, pero también como un hexámero y por lo tanto contiene 10 o 12 sitios de unión al antígeno. La forma pentamérica normalmente contiene un
45 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 en IgG, la cadena pesada en los monómeros de IgM está compuesta de una variable y cuatro dominios constantes. Los dominios constantes de IgM están designados en esta invención como CM1 o Cμ1, CM2 o Cμ2, CM3 o Cμ3 y CM4 o Cμ4, donde las denominaciones "CM" y "Cμ" se utilizan de manera intercambiable. La estructura de un pentámero de IgM se ilustra en la figura 1.

El término "IgM" se utiliza en esta invención en el sentido más amplio y específicamente incluye moléculas de IgM monoespecífica y multiespecífica (incluyendo las biespecífica), tal como, por ejemplo, las moléculas de unión a IgM
55 multiespecíficas descritas en la publicación PCT WO2015053887.

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 de 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 de dominio variable de cadena ligera (V_L) de anticuerpo asociada.
60

El término "unidad de unión a IgM biespecífica" o "unidad de unión al anticuerpo de IgM biespecífica" se utiliza en el

sentido más amplio y cubre específicamente un par de polipéptidos de región constante de cadena pesada de anticuerpo de IgM, que comprenden al menos un dominio constante CM4, fusionados a una secuencia de dominio variable (V_H), donde cada secuencia de dominio variable se une a una diana diferente, con o sin secuencias de dominio variable de cadena ligera (V_L) de anticuerpo asociadas. En una realización, el anticuerpo de IgM 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 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.

10

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 tanto, los pentámeros de IgM biespecífica y multiespecífica pueden incluir cinco unidades de unión biespecífica idénticas, unidades de unión de IgM mono-específica, donde al menos dos de ellas tienen especificidades de unión diferentes, o cualquier combinación de las mismas.

15

Una "cadena pesada de anticuerpo de IgM de longitud completa" es un polipéptido que consiste en la dirección de extremo N-terminal a extremo C-terminal de un dominio variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo, un dominio 1 constante de cadena pesada constante de anticuerpo (CM1 o $C\mu 1$), un dominio 2 constante de cadena pesada de anticuerpo (CM2 o $C\mu 2$), un dominio 3 constante de cadena pesada de anticuerpo (CM3 o $C\mu 3$) y un dominio 4 constante de cadena pesada de anticuerpo (CM4 o $C\mu 4$). Los anticuerpos de IgM de longitud completa biespecíficos tal como se definen en esta invención comprenden cinco o seis monómeros (unidades de unión), cada uno con dos sitios de unión al 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.

20

La IgA nativa es una proteína tetramérica que comprende dos cadenas ligeras idénticas (κ o λ) y dos cadenas pesadas idénticas (α). En el humano, existen dos isotipos de IgA, IgA1 e IgA2. IgA, de manera similar a IgG, contiene tres dominios constantes (CA1-CA3 o $C\alpha 1$ - $C\alpha 3$), con una región bisagra entre los dominios $C\alpha 1$ y $C\alpha 2$, donde las denominaciones "CA" y "C α " se utilizan 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 $C\alpha 3$, que permite la formación de Ig polimérica (véase, por ejemplo, Garcia-Pardo y col., 1981, J. Biol. Chem. 256, 11734-11738 y Davis y col., 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, enlazada mediante una cadena J, que puede incluir una pieza de cola, y puede estar asociada por un componente de secreción. Las estructuras de la pieza de cola, la IgA dimérica y la IgA de secreción, asociada con un componente de secreción (slgA) están ilustradas en la figura 2. Los anticuerpos de IgA pueden dividirse además en subclases IgA1 y IgA2. El término anticuerpo de "IgA" se utiliza en esta invención para incluir específicamente todas las subclases, es decir, anticuerpos de IgA1 e IgA2, que incluyen formas diméricas y multiméricas, con y sin un componente de secreción, así como los fragmentos, preferiblemente fragmentos de unión al antígeno, de tales anticuerpos. Para los fines de la presente invención, el anticuerpo de IgA preferiblemente es un dímero, donde las dos piezas de cola están conectadas por una cadena J (véase, la figura 2).

30

35

El término "IgA" se utiliza en esta invención en el sentido más amplio y específicamente incluye moléculas IgA mono-específica y multiespecífica, tal como, por ejemplo, las moléculas de unión a IgA multiespecífica descritas en la publicación PCT WO2015120474.

40

El término "IgA multiespecífica" se utiliza en esta invención en el sentido más amplio para referirse a anticuerpos de IgA con dos o más especificidades de unión. Por tanto, el término "multiespecífico" incluye "biespecífico", por ejemplo, anticuerpos biespecíficos o unidades de unión biespecífica, que incluyen dímeros de IgA que comprenden dos subunidades mono-específicas, donde cada una se une a un antígeno diferente (AA, BB), o dos subunidades biespecíficas, donde cada una se une a dos antígenos diferentes (AB, AB).

45

En una realización, las moléculas IgA multiespecífica diméricas consisten en dos unidades de unión mono-específica, 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 dimérica 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

50

ejemplo).

El término "unidad de unión al anticuerpo de IgA biespecífica" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente un par de polipéptidos de región constante de cadena pesada de anticuerpo de IgA, que comprenden al menos un dominio constante CA3, fusionados a una secuencia de dominio variable (V_H), donde cada secuencia de dominio variable se une a una diana diferente, con o sin secuencias de dominio variable de cadena ligera (V_L) de anticuerpo asociadas. 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.

Una "cadena pesada de anticuerpo de IgA de longitud completa" es un polipéptido que consiste en la dirección de extremo N-terminal a extremo C-terminal de un dominio variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo, un dominio 1 constante de cadena pesada constante de anticuerpo (CA1 o $C\alpha 1$), un dominio 2 constante de cadena pesada de anticuerpo (CA2 o $C\alpha 2$) y un dominio 3 constante de cadena pesada de anticuerpo (CA3 o $C\alpha 3$). Los anticuerpos de IgA de longitud completa biespecíficos o multiespecíficos 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 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.

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..

El término "interfaz", tal como se usa en esta invención, 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.

El término "interfaz asimétrica" se utiliza para referirse a una interfaz (tal como se define anteriormente) 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 correspondiente, 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 μ a su cadena ligera correspondiente.

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 con 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 la cantidad de residuos originales que son reemplazados es la cantidad 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).

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.

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 y col., *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 y col. *Science* 244: 182 (1989) y Ellman y col., *supra*. En resumen, esto implica la activación química de un ARNt supresor con un residuo 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 mal emparejamiento de los enlaces disulfuro.

La protuberancia es "posicionable" en la cavidad lo que significa que la ubicación espacial de la protuberancia y la cavidad en la interfaz del primer polipéptido y el segundo polipéptido respectivamente y los tamaños de la protuberancia y la cavidad son tales que la protuberancia 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 normalmente de forma perpendicular del eje de la interfaz y tienen conformaciones preferidas, la alineación de una protuberancia con una cavidad correspondiente depende del modelado de la protuberancia/par de cavidad basándose en una estructura tridimensional tal como aquella obtenida mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Esto se puede lograr utilizando ampliamente técnicas aceptadas en la técnica, que incluyen técnicas de modelado molecular.

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, 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.

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).

Preferiblemente, el residuo de aminoácido de importación para formar la protuberancia tiene una cantidad relativamente pequeña de "rotámeros" (por ejemplo, alrededor de 3-6). Un "rotámero" es una conformación favorable energéticamente de una cadena lateral de aminoácidos. La cantidad de rotámeros para los varios residuos de aminoácidos son analizados en Ponders and Richards, *J. Mol. Biol.* 193: 775-791 (1987).

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 tanto, por ejemplo, la secuencia de IgM humana se encuentra disponible con el número de acceso al registro GenBank X14940.1, mientras las variantes se han notificado como GenBank CAB37838.1, CAC20458.1, AFM37312.1, X57331.1 y J00260.1.

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 tanto, los términos "nativo" y "secuencia nativa" se utilizan en esta invención de manera intercambiable, y abarcan de forma expresa polipéptidos recombinantes con una secuencia que se encuentra en la naturaleza.

El término "cadena J de secuencia nativa" o "cadena J nativa", tal como se usa en esta invención, 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 figura 3 (SEQ ID NO: 1).

El término "cadena J modificada" se utiliza en esta invención para referirse a variantes de polipéptidos de cadena J de secuencia nativa que comprenden un resto de unión extraño introducido en la secuencia nativa. La introducción se puede lograr mediante cualquier medio, que incluye la fusión directa o indirecta de un resto de unión extraño o mediante la unión a través de un enlazador químico. El término "cadena J humana modificada" abarca de forma específica, sin limitación, una cadena J humana de secuencia nativa de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 modificada por la introducción de un resto de unión. El término abarca de forma específica, sin limitación, una cadena J humana de secuencia nativa de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 modificada mediante la introducción de un resto de unión extraño que no interfiere con la polimerización eficiente (dimerización) de IgM o IgA y la unión de tales polímeros (dímeros) a una diana.

El término "resto de unión" abarca anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno y conjugados de anticuerpo-fármaco que son capaces de unirse de forma específica a una diana, tal como un antígeno.

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 alrededor de 60, preferiblemente hasta alrededor de 30 aminoácidos unidos de forma covalente por enlaces peptídicos.

El término "extraño" con referencia a un "resto de unión" se utiliza en esta invención para referirse a un resto de unión no presente en una secuencia de polipéptido nativa de referencia en la misma ubicación. Por tanto, una secuencia de polipéptido extraño (que incluye secuencias de péptidos), puede estar comprendida dentro de la secuencia nativa correspondiente, pero en una ubicación 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 "anticuerpo monoclonal", como se usa en esta invención, 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 según la presente invención se pueden elaborar mediante el método de hibridoma, descrito por primera vez por Kohler y col. (1975) Nature 256:495, o se pueden elaborar mediante métodos de ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson y col. (1991) Nature 352:624-628 y Marks y col. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en esta invención incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en la que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular, mientras que el resto de la o las cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie, así como también fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 81:6851-6855).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos 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 con 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 y col. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann y col. (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 entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos, así como también subproductos de la producción no deseados. 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 un resto de unión a una diana de unión, tal como la unión de un anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo, un epítipo en un polipéptido, péptido particular, u otra diana (por ejemplo, una diana de glicoproteína), y significa la unión que es diferente de forma medible de una interacción no específica (por ejemplo, una interacción no específica puede ser la unión a la albúmina de suero bovino o caseína). La unión específica se puede medir, por ejemplo, al determinar la unión de un resto de unión, o un anticuerpo, o un anticuerpo modificado por la introducción de un resto de unión, a una molécula diana comparada 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 marcar. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe de forma competitiva mediante el exceso de diana sin marcar. 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 determinados 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 compañera Y puede estar representada generalmente por la constante de disociación (Kd). Por ejemplo, la Kd puede ser de alrededor de 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 por lo general se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad por lo general se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos por más tiempo. Se conoce en la técnica una variedad de métodos para medir la afinidad de unión.

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).

Los términos "conjugado" [sustantivo], "conjugado" [verbo] y "conjugación" se refiere a cualquiera y todas las formas de enlaces covalente o no covalentes, e incluyen, sin limitación, fusión genética directa o química, acoplamiento a través de un enlazador o un agente de reticulación y asociación no covalente.

El término "fusión" se utiliza en esta invención para referirse a la combinación de secuencias de aminoácidos de diferente origen en una cadena de polipéptidos 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 de polipéptidos, además de la fusión a uno de sus extremos terminales. El término "fusión" se utiliza en esta invención para referirse a la combinación de secuencias de aminoácidos de diferente origen.

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 tal, los términos "bivalente", "tetraivalente" y "hexavalente" denotan la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente. Por tanto, si en un anticuerpo de IgA

5 biespecífica según la presente invención cada unidad de unión es bivalente, el anticuerpo de IgA biespecífica tendrá 4 valencias.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante molecular capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un determinante de epítipo incluye agrupamientos de superficie químicamente activa de

10 moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, 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 unido por un anticuerpo. Una "región de unión" es una región en una diana de unión unida mediante una molécula de unión.

15 La "especificidad poliepitópica" hace referencia a la capacidad de unirse 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 biespecífica se une a cada epítipo con una afinidad de al menos 10^{-7} M, o 10^{-8} M o mejor.

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

El término "antígeno" se refiere a una entidad o fragmento del mismo, que puede unirse a un anticuerpo o

25 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.

30 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.

Un "sitio de unión al antígeno" o "región de unión al antígeno" de un anticuerpo de la presente invención normalmente contiene seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuyen en varios grados con la afinidad

35 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

40 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 se encuentran específicamente incluidos dentro de la presente definición.

45 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 utilizan células de ovario de hámster chino (CHO) como células hospedadoras.

50 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 cuestión y los cultivos derivados de esta sin importar la cantidad de transferencias. Se entiende también que toda la progenie puede no 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

55 o actividad biológica que la evaluada 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 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

60 potenciador está unido de forma operativa a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia, o un sitio de unión a un 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 unen son

contiguas, y, en el caso de una 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 estos sitios, se usan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

5

El término "antagonista", como se usa en esta invención, 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 esta invención, se refiere a provocar una

10 disminución en una función o actividad.

El término "agonista", como se usa en esta invención, 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 esta invención, se refiere a provocar un aumento en una función o actividad.

15

El término "vía de señalización inhibidora de células T", como se usa en esta invención, 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.

20

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

25

El término "diana de expresión de bajo nivel", como se usa en esta invención, 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. Las pautas para determinar el nivel de expresión a través de IHC son proporcionadas, por ejemplo, por el College of American Pathologists (CAP), y están ejemplificadas por las recomendaciones de las pautas de la prueba ASCO-CAP HER2, disponibles en http://www.cap.org/apps/docs/committees/immunohistochemistry/summary_of_recommendations.pdf.

30

El término "diana de baja afinidad", como se usa en esta invención, 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 por ELISA.

35

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.

45

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 unidos a N: Asn-171, Asn-332, Asn-395, Asn-402 y Asn-563.

55

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, FcαR, son mediadores clave de la función efectora de

60

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 (plgR). Durante este proceso, el plgR 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 p) e IgA (α p) 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 de unión que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T, sin interferir con la capacidad del anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA para unirse a su(s) diana(s) de unión. La molécula de unión puede, por ejemplo, ser un anticuerpo de IgM, un anticuerpo de IgA, o un anticuerpo híbrido de IgG/IgM o IgG/IgA, que puede contener una pieza de cola de IgM o IgA en la cadena pesada de IgG y por tanto combina las propiedades de IgG e IgA o IgA, que incluye la capacidad de incorporar y formar polímeros con una cadena J modificada cuyo resto de unión antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T. Para detalles adicionales en anticuerpos híbridos de IgG/IgM e IgG/IgA, véase, por ejemplo, Koteswara y col., *Clinical Immunology* 2001, 101(1):21-31. Una ilustración de un ejemplo de molécula de unión según aspectos de la invención se representa en la figura 6. La molécula de unión representada comprende un pentámero de IgM con especificidad de unión para un antígeno diana, y comprende un resto de unión unido a la cadena J.

Las vías de señalización inhibidora de células T se conocen en la técnica e incluyen, sin limitación, las descritas en Pardoll, Drew M. "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy". *Nature Reviews Cancer* 12.4 (2012): 252-264, cuya descripción se ha incorporado por referencia en su totalidad en esta invención. Los ejemplos no limitantes de vías de señalización inhibidora de células T y componentes de las mismas se describen con más detalle a continuación.

La proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas y se ha demostrado que transmite una señal inhibidora a las células T. La isoforma unida a la membrana de CTLA4 funciona como un homodímero interconectado por un enlace disulfuro, mientras que la isoforma soluble funciona como un monómero. *Por ejemplo.*, Pardoll en 255.

Además de CTLA4, otras vías de señalización inhibidora de células T incluyen, por ejemplo, aquellas que involucran la muerte celular programada-1 (PD-1) y su ligando, ligando-1 de muerte celular programada (PD-L1). La PD-1 es una proteína receptora inhibidora 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 una vía de señalización inhibidora de células T es la vía de señalización que involucra inmunoglobulina de células T y dominio 3 de mucina (TIM3). TIM3 es una glicoproteína de la superficie celular que se expresa en la superficie de las células T y funciona como una molécula inhibidora que participa en la terminación de las células Th1. *Id.*

Otro ejemplo de una vía de señalización inhibidora de células T es la vía de señalización que involucra al gen 3 de activación de linfocitos (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.*

Otro ejemplo de una vía de señalización inhibidora de células T es la vía de señalización que involucra a la proteína atenuadora de linfocitos B y T (BTLA). BTLA es una proteína de la superficie celular que funciona inhibiendo las células T mediante la interacción con miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. Se sabe que BTLA regula negativamente las respuestas inmunitarias de las células T.*Id.*

Otro ejemplo de una vía de señalización inhibidora de células T es la vía de señalización que implica el supresor de Ig de dominio V de la activación de células T (VISTA). VISTA es un regulador de la función de las células T que se expresa en las células hematopoyéticas y los leucocitos, y funciona suprimiendo la activación de las células T. *Por ejemplo.*, Lines JL, y col., Cancer research. 2014;74(7):1924-1932.

Otro ejemplo de una vía de señalización inhibidora de células T es la vía de señalización que involucra al inmunorreceptor de células T de proteína con dominios Ig e ITIM (TIGIT). TIGIT se expresa en varias clases de células T y se une con alta afinidad al receptor de poliovirus. TIGIT suprime la activación de las células T al promover la generación de células dendríticas inmunorreguladoras maduras. *Por ejemplo.*, Yu X. y col., Nat Immunol. 2009 Jan;10(1):48-57.

Como se revisó anteriormente, las moléculas de unión en cuestión comprenden un resto de unión en la cadena J que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T. En algunas realizaciones, un resto de unión en la cadena J se une a una diana en una vía de señalización inhibidora de células T y, por lo tanto, bloquea o disminuye las señales inhibidoras que son recibidas por una célula T a través de la vía. 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 resto de unión en la cadena J de una molécula de unión en cuestión se puede usar para antagonizar cualquier vía de señalización inhibidora de células T, incluyendo, pero no se limita a, las vías de señalización inhibidora que implican las proteínas enumeradas en la Tabla 1, 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 inhibidora de células T se proporcionan en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1: Información de secuencia para las dianas de la vía de señalización inhibidora de células T

Miembro de la vía de señalización inhibidora de células T:	N.º de acceso al registro de GenBank
CTLA4	AAL07473.1
PD-1	AAC51773.1
TIM3	AAL65158.1
LAG3	AAH52589.1
BTLA	AAI07092.1
VISTA	NP_071436.1
TIGIT	NP_776160.2

Un resto de unión en la cadena J de una molécula de unión en cuestión puede incluir anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno y conjugados de anticuerpo-fármaco. Se enfatiza que cualquier tipo de resto de unión se puede introducir en una cadena J, siguiendo las enseñanzas de la presente descripción, al seleccionar de forma apropiada la ubicación y tipo de adición (por ejemplo, fusión directa o indirecta, inmovilización química, etc.).

En una realización preferida, el resto de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo (también denominado un "fragmento de anticuerpo"), que incluye anticuerpos monoespecíficos, biespecíficos y multiespecíficos y fragmentos de anticuerpo, que funciona como un antagonista de una vía de señalización inhibidora de células T. El término "fragmento de anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio e incluye, sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, y (scFv)₂, fragmentos de la región determinante de 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 de cadena simple (scFv).

Un resto de unión en una cadena J se puede introducir en la secuencia de cadena J nativa en cualquier ubicación que permite la unión del resto de unión a su diana de unión sin interferir con la unión de la molécula de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA receptora con su diana de unión 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 realizaciones preferidas, el resto de unión se introduce en la cadena J de secuencia nativa sin aproximadamente 10 residuos del extremo C-terminal o sin aproximadamente 10 residuos de aminoácidos del extremo N-terminal, donde la cadena J de secuencia nativa es preferiblemente la cadena J humana de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el resto de unión se introduce 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 una ubicación equivalente de otra cadena J de secuencia nativa. En una realización adicional, el resto de unión se introduce en una cadena J de secuencia nativa, tal como una cadena J de la SEQ ID NO: 1, en o cerca de un sitio de glicosilación. Lo más preferiblemente, el resto de unión se introduce en la cadena J humana de secuencia nativa de SEQ ID NO: 1 dentro de alrededor de 10 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal.

10

La introducción se puede lograr mediante fusión directa o indirecta, es decir, mediante la combinación de las secuencias de aminoácidos de restos de unión y la cadena J en una cadena de polipéptidos mediante la combinación en marco de sus secuencias de nucleótidos de codificación, con o sin un enlazador peptídico. El enlazador peptídico (fusión indirecta), si se utiliza puede, por ejemplo, ser de alrededor de 1 a 50, o alrededor de 1 a 40, o alrededor de 1 a 30, o alrededor de 1 a 20, o alrededor de 1 a 10, o alrededor de 10 a 20 residuos de aminoácidos, y pueden estar presentes en uno o ambos extremos del resto de unión para ser introducido en la 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.

15

Un resto de unión también puede estar adjunto a la secuencia de cadena J nativa mediante enlace químico utilizando agentes reticulantes de proteína heterobifuncional que contienen dos grupos funcionales, que tienen su propia reactividad y selectividad. 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. Por tanto, por ejemplo, un reactivo de reticulación heterobifuncional se puede utilizar para formar conjugados entre una cadena J y un resto de unión. Los grupos reactivos incluyen, sin limitación, grupos reactivos de imina (tal como NHS o Sulfo-NHS), grupos de 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 enzimáticamente lábil muy estudiado y conocido es un enlazador de valina-citrulina, pero otros enlazadores peptídicos también son conocidos y adecuados. 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 y col., *Protein Engineering, Design & Selection*; 2014, 27(10): 325-330.

20

25

30

35

En algunas realizaciones, una molécula de unión comprende una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 7. 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 7, por ejemplo, tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, o alternativamente 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o alrededor de 99,9 % de identidad de secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos que se enumera en la Tabla 7.

40

Mientras la cadena J modificada generalmente contiene un resto de unión extraño, también es posible introducir más de un resto de unión en una cadena J. En algunas realizaciones, una cadena J modificada comprende un resto de unión extraño. En algunas realizaciones, una cadena J modificada comprende más de un resto de unión extraño. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se introduce un resto de unión en una cadena J modificada en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal. En algunas realizaciones, se introduce un primer resto de unión en una cadena J modificada en el extremo N-terminal, y se introduce un segundo resto de unión en la misma cadena J modificada en el extremo C-terminal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se introduce un primer resto de unión en una cadena J modificada en el extremo N-terminal, y se introduce un segundo resto de unión en la misma cadena J modificada en el extremo C-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 esta invención una molécula de unión que comprende una cadena J "bidentada".

45

50

55

La cadena J modificada se puede producir mediante técnicas bien conocidas de tecnología de ADN recombinante, al expresar ácido nucleico que codifica la cadena J modificada en un organismo hospedador procariota o eucariota adecuado, tal como las células CHO o *E. coli*. Por tanto, la cadena J modificada, por ejemplo, puede expresarse en *E. coli*, como se describe por Symersky y col., *Mol Immunol* 2000, 37:133-140.

60

En una realización, la cadena J se puede modificar inicialmente mediante la inserción de un sitio de reconocimiento de enzima, y se puede modificar postraduccionalmente mediante un enlazador peptídico o no peptídico, que puede

inmovilizar cualquier resto de unión extraño a la cadena J, tal como, por ejemplo, la molécula pequeña citotóxica para elaborar un conjugado de anticuerpo-fármaco (CAF).

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 estructura compleja, la producción a gran escala de IgM recombinante ha sido difícil, se han notificado varios sistemas de producción recombinante para IgM utilizando células no linfoides, que incluyen la coexpresión de las cadenas pesada (H) y ligera (L) de IgM en células de glioma C6, células CHO, y células HeLa (véase, por ejemplo, el documento WO89/01975 y Wood y col., 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 y col., Clin Cancer Res 2007, 13(9):2745-2750. La producción de IgM en una línea celular immortalizada de la retina humana que expresa las proteínas E1A y E1B de un adenovirus se describe en la publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 20060063234.

El anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA receptor puede ser monoespecífico, biespecífico o multispecífico. Las moléculas de unión de IgM e IgA biespecíficas y multispecíficas, incluidos los anticuerpos, se describen, por ejemplo, en las publicaciones PCT WO 2015053887 y WO2015120474.

Una molécula de unión en cuestión puede unirse a cualquier diana de unión a través del anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA, mientras que el resto de unión de la cadena J antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T. Como tal, las moléculas de unión en cuestión se pueden usar para localizar la funcionalidad del resto de unión de la cadena J en la ubicación de una diana de unión que está dirigida por el anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA. Las clases de dianas de anticuerpos se describen con más detalle a continuación.

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* y col. 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 una vía de señalización inhibitoria de células T es la vía de señalización que involucra la muerte celular programada 1 (PD-1) y su ligando, el ligando 1 de muerte celular programada (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 una vía de señalización inhibitoria de células T es la vía de señalización que involucra inmunoglobulina de células T y dominio 3 de mucina (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 participa en la terminación de las células Th1. *Id.*

Otro ejemplo de una vía de señalización inhibitoria de células T es la vía de señalización que involucra al gen 3 de activación de linfocitos (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 cuestión comprenden un resto de unión de la cadena J que antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T. En algunas realizaciones, un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a una diana que está involucrada en una vía de señalización inhibitoria de células T y antagoniza la vía de señalización inhibitoria, bloqueando o disminuyendo así las señales inhibitorias que son recibidas por una célula T a través de la vía, mientras que el resto de unión de la cadena J también antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T. Debido a su mayor avidez, los anticuerpos de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA en cuestión 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 cuestión se puede usar para antagonizar cualquier vía de señalización inhibitoria de células T, incluyendo, pero no se limita a, las vías de señalización inhibitoria que implican las proteínas enumeradas en la Tabla 2, 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 2, a continuación.

Tabla 2: 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* y col. 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.
- 10 CD137 es un miembro de la superfamilia del receptor 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 de receptores 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 inmunitaria a lo largo del tiempo. *Id.*
- 15 Otra vía de señalización estimuladora de las células T involucra al CD40. CD40 es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y se expresa en células presentadoras de antígenos. El compromiso de CD40 con su ligando CD40L da como resultado varias señales estimulantes de células T. *Id.*
- 20 Otra vía de señalización estimuladora de células T implica la proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR). GITR es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y se expresa en las células T. Funciona aumentando la proliferación, activación y producción de citocinas de las células T. *Por ejemplo*, Nocentini, G. y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 10 de junio de 1997; 94(12):6216-21.
- 25 CD27 es otra proteína que participa en una vía de señalización estimuladora de células T. Otro miembro de la superfamilia de receptores 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 CD70. *Por ejemplo*, *Pardoll* en 254.
- Otra vía de señalización estimuladora de células T implica el mediador de entrada del virus del herpes (HVEM). HVEM es un miembro de 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.*
- 30 Como se revisó anteriormente, las moléculas de unión en cuestión comprenden un resto de unión en la cadena J que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T. En algunas realizaciones, un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a una diana que está involucrada en una vía de señalización estimuladora de células T y agoniza la vía de señalización estimuladora, manteniendo o aumentando así las señales estimulantes que son recibidas por una célula T a través de la vía, mientras que el resto de unión en la cadena J antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T. Debido a su mayor avidez, los anticuerpos de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA en
- 40 cuestión 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 cuestión para agonizar cualquier vía de señalización estimuladora de células T, incluyendo, pero no se limita a, las vías de señalización estimuladora que implican las proteínas enumeradas en la Tabla 3, a
- 45 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 3, a continuación.

Tabla 3: 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

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

Otros ejemplos no limitantes de vías de señalización estimuladora de células T incluyen aquellos mediados por: TNFR1 (DR1) (número de acceso al registro de GenBank P19438.1); TNFR2 (número de acceso al registro de GenBank P20333.3); Fas (CD95, Apo1, DR2) (número de acceso al registro GenBank AAH12479.1); CD30 (número de acceso al registro GenBank AAA51947.1); TRAILR1 (DR4, Apo2) (número de acceso al registro GenBank 000220.3); DR5 (TRAILR2) (número de acceso al registro GenBank 014763.2); TRAILR3 (DcR1) (número de acceso al registro GenBank 014798.3); TRAILR4 (DcR2) (número de acceso al registro GenBank Q9UBN6.1); OPG (OCIF) (número de acceso al registro GenBank 000300.3); TWEAKR (FN14) (número de acceso al registro GenBank Q9NP84.1); DcR3 (número de acceso al registro GenBank 095407.1); DR3 (número de acceso al registro GenBank AAQ88676.1); EDAR (número de acceso al registro GenBank Q9UNE0.1); y XEDAR (número de acceso al registro GenBank AAQ89952.1). Véase, por ejemplo, Aggarwal y col., Blood, 119:651-665, 2012. En algunas realizaciones, un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a una cualquiera de estas dianas y agoniza una vía de señalización estimuladora de células T, manteniendo o aumentando así las señales estimulantes que son recibidas por una célula T a través de la vía, mientras que el resto de unión en la cadena J antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T.

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 cuestión son más potentes que los anticuerpos IgG. Como tal, las moléculas de unión en cuestión 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 cuestión 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 cuestión 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 4, a continuación.

Tabla 4: Información de 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

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 cuestión son más potentes que los anticuerpos IgG. Como tal, las moléculas de unión en cuestión 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 cuestión 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 cuestión incluyen, sin limitación, NY-

ESO-1, antígeno Sialyl Lewis X y antígeno Tn. Los números de acceso al registro GenBank correspondientes a las secuencias de proteínas humanas del antígeno NY-ESO-1 y Sialyl Lewis X se proporcionan en la Tabla 5, a continuación. La estructura del antígeno Tn se proporciona en la figura 4.

5

Tabla 5: Información de 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

Líneas 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 cuestión son más potentes que los anticuerpos IgG. Como tal, las moléculas de unión en cuestión 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 cuestión facilita la unión entre un anticuerpo y una diana. Se puede usar un anticuerpo de una molécula de unión en cuestión para 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 cuestión incluyen, sin limitación, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52 y CD70. 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.

20

Tabla 6: Información de 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	AJC19276.1
CD70	NP_001243.1

Aplicaciones de moléculas de unión con cadena J modificada

Las moléculas de unión que comprenden una cadena J modificada de la presente invención tienen aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico generalizadas, que incluyen, pero no se limitan, al tratamiento de varios cánceres y enfermedades inmunitarias mediante la modulación, entre otras cosas, de la actividad de una respuesta inmunitaria a células T. Las moléculas de unión en cuestión que comprenden una cadena J modificada pueden usarse ampliamente para el tratamiento de cualquiera de una variedad de cánceres. Se anticipa que se puede elegir como diana cualquier tipo de tumor y cualquier tipo de antígeno asociado a tumores por las moléculas de unión en cuestión. 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, 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 materia entenderá que los antígenos asociados a los tumores son conocidos en la técnica para prácticamente cualquier tipo de cáncer.

En algunas realizaciones, una cadena J de una molécula de unión en cuestión incluye un resto de unión que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T, y el anticuerpo también antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T. Sin apegarse a la teoría, el propósito de dicha molécula de unión es bloquear o disminuir la señalización inhibidora de las células T a través del anticuerpo y el resto de unión en la cadena J. Dichas moléculas de unión proporcionan un bloqueo o una disminución de la señalización inhibidora de las células T, manteniendo o aumentando así una respuesta inmunitaria de las células T en una ubicación específica, como, por ejemplo, la superficie de una célula cancerosa. Debido a su mayor avidez, los anticuerpos de IgM, IgA, IgG/IgM y IgG/IgA en cuestión actúan de forma más efectiva como antagonistas cuando se dirigen a determinadas dianas de unión, como

los miembros de una vía de señalización inhibidora de células T, como se describió 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.

5

Los cánceres epiteliales que son adecuados para el tratamiento con las moléculas de unión en cuestión que tienen un anticuerpo antagonista y un resto de unión al antagonista en la cadena J incluyen, sin limitación, melanoma, pulmón de células no pequeñas, cáncer nasofaríngeo, colorrectal, de hígado, de vejiga urinaria, de ovario, gástrico, esofágico, pancreático, renal, de tiroides o de mama, cáncer de mama con receptores hormonales negativos o triple negativo.

10 Los cánceres hematológicos que son adecuados para el tratamiento con las moléculas de unión en cuestión que tienen un anticuerpo antagonista y un resto de unión antagonista 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 cuestión encuentran uso en el tratamiento de cualquiera de estas afecciones.

15

En algunas realizaciones, una cadena J de una molécula de unión en cuestión incluye un resto de unión que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T, mientras que el anticuerpo agoniza una vía de señalización estimuladora de células T. Sin apegarse a la teoría, el propósito de dicha molécula de unión es bloquear o disminuir la señalización inhibidora de células T a través del resto de la cadena J, mientras que simultáneamente mantiene o

20 aumenta la señalización estimuladora de células T a través del anticuerpo. Tales moléculas de unión localizan un bloqueo o disminución de la señalización inhibidora de células T (facilitada por el resto de unión en la cadena J) en el mismo sitio que el mantenimiento o activación de la señalización estimuladora de células T (facilitada por el anticuerpo), manteniendo o aumentando así una respuesta inmunitaria de células T en una ubicación específica, como, por ejemplo, la superficie de una célula cancerosa. Debido a su mayor avidez, los anticuerpos de IgM, IgA, IgG/IgM y

25 IgG/IgA en cuestión actúan de forma más efectiva como agonistas cuando se dirigen a determinadas dianas de unión, como los miembros de una vía de señalización estimuladora de células T, como se describe 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

30

hematológicos.

Los cánceres epiteliales que son adecuados para el tratamiento con las moléculas de unión en cuestión que tienen un anticuerpo agonista y un resto de unión al antagonista en la cadena J incluyen, sin limitación, melanoma, pulmón de células no pequeñas, cáncer nasofaríngeo, colorrectal, de hígado, de vejiga urinaria, de ovario, gástrico, esofágico,

35 pancreático, renal, de tiroides o de mama, cáncer de mama con receptor hormonal negativo o cáncer de mama triple negativo. Los cánceres hematológicos que son adecuados para el tratamiento con las moléculas de unión en cuestión que tienen un anticuerpo agonista y un resto de unión a antagonista 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,

40

las moléculas de unión en cuestión encuentran uso en el tratamiento de cualquiera de estas afecciones.

En algunas realizaciones, una cadena J de una molécula de unión en cuestión incluye un resto de unión que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T, mientras que el anticuerpo se une a una diana de expresión de bajo nivel. Sin apegarse a la teoría, el propósito de dicha molécula de unión es bloquear o disminuir la señalización

45 inhibidora de las células T a través del resto de unión en la cadena J, mientras se une simultáneamente a una diana de expresión de bajo nivel utilizando la avidez más alta del anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA. Dichas moléculas de unión proporcionan la localización del bloqueo o disminución de la señalización inhibidora de células T en el sitio de una diana de expresión de bajo nivel, y encuentran utilidad en el tratamiento de enfermedades donde el mantenimiento o la activación de una respuesta inmunitaria de células T es deseable en la ubicación de una diana de

50 expresión de bajo nivel, como, por ejemplo, ciertos cánceres y trastornos inmunitarios. 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

55 realizaciones, las moléculas de unión en cuestión encuentran uso en el tratamiento de cualquiera de estas afecciones.

En algunas realizaciones, una cadena J de una molécula de unión en cuestión incluye un resto de unión que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T, mientras que el anticuerpo se une a una diana de baja afinidad. Sin apegarse a la teoría, el propósito de dicha molécula de unión es bloquear o disminuir la señalización

60 inhibidora de las células T a través del resto de unión en la cadena J, mientras que simultáneamente se une a una diana de baja afinidad utilizando la avidez más alta del anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA. Tales moléculas de unión proporcionan la localización del bloqueo o disminución de la señalización inhibidora de células T en el sitio

de una diana de baja afinidad. Como se señaló anteriormente, debido a su mayor avidez, los anticuerpos de IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA en cuestión, que comprenden una cadena J modificada, son especialmente ventajosos en situaciones donde los anticuerpos de IgG se unen a su diana con afinidad baja. Por tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos de IgM, IgA, IgG/IgM e IgG/IgA descritos en esta invención pueden comprender el dominio de unión de un anticuerpo de IgG terapéutica. Tales moléculas de unión encuentran utilidad en el tratamiento de enfermedades donde es deseable el mantenimiento o la activación de una respuesta inmunitaria de células T en la ubicación de una diana de baja afinidad, como, por ejemplo, ciertos cánceres y trastornos inmunitarios. Por ejemplo, se sabe que ciertos cánceres epiteliales expresan antígenos tumorales que tienen una baja afinidad de unión, 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 cuestión encuentran uso en el tratamiento de cualquiera de estas afecciones.

En algunas realizaciones, una cadena J de una molécula de unión en cuestión incluye un resto de unión que antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T, mientras que el anticuerpo se une a una diana en una célula cancerosa hematológica. Sin apegarse a la teoría, el propósito de dicha molécula de unión es bloquear o disminuir la señalización inhibitoria de las células T a través del resto de unión en la cadena J, mientras que simultáneamente se une a una diana de cáncer hematológico utilizando la avidez más alta del anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA. Dichas moléculas de unión proporcionan la localización del bloqueo o disminución de la señalización inhibitoria de células T en el sitio de una diana de cáncer hematológico, tal como, por ejemplo, en la superficie de una célula cancerosa hematológica. Tales moléculas de unión encuentran utilidad en el tratamiento de cánceres hematológicos. 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 cuestión encuentran uso en el tratamiento de cualquiera de estas afecciones.

Los ejemplos de anticuerpos de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA incluida una cadena J modificada que antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T, pueden incluir las regiones de unión de anticuerpos IgG conocidos a antígenos asociados al tumor, como, por ejemplo, blinatumomab (también conocido como MT103) (anti-CD19), CD19hA19 (anti-CD19, patente de Estados Unidos n.º 7.109.304), hPAM4 (anti-mucina, patente de Estados Unidos n.º 7.282.567), hA20 (anti-CD20, patente de Estados Unidos n.º 7.251.164), hIMMU31 (anti-AFP, patente de Estados Unidos n.º 7.300.655), hLL1 (anti-CD74, patente de Estados Unidos n.º 7.312.318), hLL2 (anti-CD22, patente de Estados Unidos n.º 7.074.403), hMu-9 (anti-CSAp, patente de Estados Unidos n.º 7.387.773), hL243 (anti-HLA-DR, patente de Estados Unidos n.º 7.612.180), hMN-14 (anti-CEACAM5, patente de Estados Unidos n.º 6.676.924), hMN-15 (anti-CEACAM6, patente de Estados Unidos n.º 7.541.440), hRS7 (anti-EGP-1, patente de Estados Unidos n.º 7.238.785), hMN-3 (anti-CEACAM6, patente de Estados Unidos n.º 7.541.440), Ab124 y Ab125 (anti-CXCR4, patente de Estados Unidos n.º 7.138.496).

Otros anticuerpos que pueden proporcionar regiones de unión para utilizar en combinación con una cadena J modificada que antagoniza una vía de señalización inhibitoria de células T incluyen, por ejemplo, abcximab (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), adecatumumab (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 Estados Unidos 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 y col., 2011, Diabetes 45:881-85), MTNFAI, M2TNFAI, M3TNFAI, M3TNFABI, M302B, M303 (Thermo Scientific, Rockford, 111.), 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 y col., 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 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 Estados Unidos n.º 8.333.971), Ab 75, Ab 76, Ab 77 (Paulik y col., 1999, Biochem Pharmacol 58:1781-90), así como los anticuerpos anti-VIH descritos en la patente de Estados Unidos n.º 5.831.034, patente de Estados Unidos n.º 5.911.989, y Vcelar y col., AIDS 2007; 21(16):2161-2170 y Joos y col., Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50(5):1773-9.

10

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a CTLA4 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por CTLA4. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a TIM3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIM3. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a LAG3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por LAG3. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a BTLA y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por BTLA. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a VISTA y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por VISTA. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a TIGIT y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIGIT. Dichas moléculas de unión encuentran uso en el tratamiento de cánceres, incluyendo, pero no se limitan a, cánceres epiteliales y cánceres hematológicos.

30

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a CTLA4 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por CTLA4. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a TIM3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIM3. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a LAG3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por LAG3. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a BTLA y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por BTLA. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a VISTA y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por VISTA. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a TIGIT y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIGIT. Dichas moléculas de unión encuentran uso en el tratamiento de cánceres, incluyendo, pero no se limitan a, cánceres epiteliales y cánceres hematológicos.

50

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a CTLA4 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por CTLA4. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-1. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a LAG3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por LAG3. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de 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 de unión en la cadena J que se une a BTLA y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por BTLA. En una realización específica, una

60

IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD33 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a TIGIT y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIGIT. Dichas moléculas de unión encuentran uso en el tratamiento de cánceres, incluyendo, pero no se limitan a, cánceres hematológicos.

- 5 En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD38 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a CTLA4 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por CTLA4. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD38 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-1. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de
- 10 IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD38 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a TIM3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIM3. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD38 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a LAG3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por LAG3. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD38 tiene un resto de
- 15 unión en la cadena J que se une a BTLA y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por BTLA. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD38 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a VISTA y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por VISTA. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD38 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a TIGIT y antagoniza una vía de
- 20 señalización inhibidora de células T mediada por TIGIT. Dichas moléculas de unión encuentran uso en el tratamiento de cánceres, incluyendo, pero no se limitan a, cánceres hematológicos.

En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD52 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a CTLA4 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por CTLA4. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD52 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por PD-1. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD52 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a TIM3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIM3. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD52 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a LAG3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por LAG3. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD52 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a BTLA y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por BTLA. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD52 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a VISTA y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por VISTA. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD52 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a TIGIT y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIGIT. Dichas moléculas de unión encuentran uso en el tratamiento de cánceres, incluyendo, pero no se limitan a, cánceres hematológicos.

- 40 En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD70 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a CTLA4 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por CTLA4. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD70 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a PD-1 y antagoniza una vía de señalización
- 45 inhibidora de células T mediada por PD-1. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD70 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a TIM3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIM3. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD70 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a LAG3 y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por LAG3. En una realización
- 50 específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD70 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a BTLA y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por BTLA. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD70 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a VISTA y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por VISTA. En una realización específica, una molécula de unión cuyo anticuerpo de IgM, IgA,
- 55 IgG/IgM, o IgG/IgA se une a CD70 tiene un resto de unión en la cadena J que se une a TIGIT y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por TIGIT. Dichas moléculas de unión encuentran uso en el tratamiento de cánceres, incluyendo, pero no se limitan a, cánceres hematológicos.

Se debe entender que un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA que se une a cualquiera de los antígenos 60 tumorales enumerados se puede combinar con una cadena J modificada con cualquiera de las especificidades de unión enumeradas en esta invención para crear una molécula de unión. Por tanto, cualquier diana de anticuerpo enumerada en esta invención se puede combinar con cualquier diana de cadena J modificada enumerada en esta

invención.

Mientras se hace referencia de forma específica a determinadas reivindicaciones preferidas en esta invención, se debe entender que los anticuerpos de 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 un resto de unión que se une a cualquier diana que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T se contemplan y se encuentran dentro del alcance de la presente invención, como se define en las reivindicaciones. La figura 7 proporciona una lista de dianas de anticuerpos y dianas para el resto de unión de una cadena J. Cualquiera de las dianas de anticuerpos enumeradas en la columna de la izquierda de la figura 7 se puede combinar con cualquiera de las dianas de resto de unión para la cadena J enumeradas en la columna de la derecha de la figura 7.

En una realización preferida, un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA se une a una o más de las dianas tumorales enumeradas en esta invención, mientras que la cadena J comprende un resto de unión que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T.

En una realización preferida, una cadena J de una molécula de unión en cuestión incluye un resto de unión que es un scFv y que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T al unirse a una diana en la vía.

En una realización preferida, el resto de unión en la cadena J es un scFv que se une a CTLA4 (es decir, es un anti-CTLA4) y antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por CTLA4.

En una realización preferida, una molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une a PD-L1, y el resto de unión en la cadena J es un anti-CTLA4 que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por CTLA4.

En una realización preferida, una molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une a PD-1, y el resto de unión en la cadena J es un anti-CTLA4 que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por CTLA4.

En una realización preferida, una molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une a TIM3, y el resto de unión en la cadena J es un anti-CTLA4 que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por CTLA4.

En una realización preferida, una molécula de unión incluye un anticuerpo IgM que se une a LAG3, y el resto de unión en la cadena J es un anti-CTLA4 que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediada por CTLA4.

En todas las realizaciones, el resto de unión en una cadena J modificada se puede introducir antes o después de la cadena J. Por tanto, por ejemplo, una cadena J modificada con un resto de unión a scFv que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T mediante la unión a CTLA4 puede tener una configuración anti-CTLA4_{scFv}-J o J-anti-CTLA4_{scFv}. En la figura 5 se muestra una ilustración esquemática de ambas configuraciones.

Debido a su mayor avidez, las moléculas de unión en cuestión 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 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

Para usos terapéuticos, una molécula de unión en cuestión se puede formular 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 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 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.

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. Asimismo, 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.

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 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 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.

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.

Los siguientes Ejemplos no limitantes ilustran detalles adicionales de la invención.

Ejemplo 1: Preparación de un anticuerpo IgM anti-PD-L1 biespecífico que comprende una cadena J modificada con un resto de unión que se une a CTLA4

1. Generación de construcciones de ADN con mutaciones designadas:

- a. Síntesis de construcción de ADN. Todas las construcciones de ADN con mutaciones diseñadas están sintetizadas por los proveedores comerciales (Genescript), con sitios de restricción compatibles en ambos extremos para subclonar en vectores de expresión respectivos.
- b. Construcción de vectores de expresión Las construcciones de ADN sintetizado están resuspendidas 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 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.
- i. La primera construcción está compuesta de una versión de scFv anti-CTLA4 fusionado con el extremo N-terminal de la cadena J humana (CTLA4 scFv-15 aa enlazador-J). La secuencia de aminoácidos de esta construcción (Y15J) es:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGN
 NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGGQT
 LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWY
 QQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
 WTFGGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGGSQEDERIVLDNKCKCARITSRIIRSSSEDPNE
 DIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNIC

2. DEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPD (SEQ ID NO: 2)

- ii. La segunda construcción está compuesta de un scFv anti-CTLA4 fusionado con el extremo C-terminal de la cadena J humana (J-15 aa enlazador-CTLA4 scFv). La secuencia de aminoácidos de esta construcción (J15Y)

es:

QEDERIVLVDNKCKCARITSRIHRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFV
YHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYG
GETKMVETALTPDACYPDGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA
ASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNKNTL
YLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI
VLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIP
5 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQGSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 3)

Ambas construcciones están diseñadas para permitir la integración de la cadena J en una IgM que es específica para PD-L1.

- 10 Cadena pesada de IgM: esta construcción de cadena pesada tiene una cadena μ de longitud completa con una región Vh derivada de un anticuerpo anti-PD-L1:

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWI
HWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED
TAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCL
AQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHV
VCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQ
VSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDH
RGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTYSVTISWTR
QNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQQTISR
PKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKY
VTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTG
KPTLYNVSLVMSDTAGTCY (SEQ ID NO: 4)

- 15 Esta construcción de cadena pesada tiene un peso molecular de aproximadamente 64 kD y cuando se coexpresa con la cadena ligera, la IgM resultante se diseña para unirse a PD-L1 sobreexpresada en células tumorales.

d. La cadena ligera de esta IgM biespecífica se deriva de un anticuerpo anti-PD-L1:

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
TLTSLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 5)

- 25 La construcción de cadena ligera tiene un peso molecular de alrededor de 24 kD y cuando se expresa conjuntamente con la cadena pesada apropiada (SEQ ID NO: 4) está designada para unirse a PD-L1 en células tumorales.

2. Expresión, purificación y caracterización de proteínas

- 30 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 PEI con células CHO-S se lleva a cabo según las técnicas establecidas (véase "Biotechnology and Bioengineering, Vol 87, 553-545").

b. Inmunoprecipitación

i. IgM de Capture Select (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.

c. Electroforesis en gel

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 proteínas 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. (figura 8)

ii. SDS-PAGE reductora. Se agregan el tampón de muestra de LDS de NuPage (Life Technologies) y el agente reductor de NuPage ditiotreitól (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 MES SDS de NuPage (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. Detección por inmunoelectrotransferencia Después de que la electroforesis se haya completado, quitar el gel de la minicelda XCell SureLock. Transferir a la membrana de PVDF a 30 voltios durante 1 hora (referirse al manual de Life Technologies). Bloquear con 20 ml de ASB al 3 % en PBST a 25 °C durante 1 hora.

Para el análisis de inmunoelectrotransferencia anti-cadena J, agregar anti J (SP105, Thermo Fisher) a 1:500 en ASB al 3 % en PBST durante la noche a 4 °C. Lavar con PBST cuatro veces a temperatura ambiente. Agregar IgG de conejo anti-cabra-PRP (Jackson Immunology) a 1:5.000 en ASB al 3 % en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Lavar con PBST 4 veces a temperatura ambiente. Agregar 10 ml de sustrato quimioluminiscente de PRP (Thermo Fisher) durante 10 minutos antes de exponer la membrana a la película. El anticuerpo anti-cadena J solo reacciona con IgM que se coexpresa con la cadena J no modificada o la cadena J modificada. Como se muestra en la figura 8, la IgM anti-PD-L1 con la cadena J de tipo salvaje o la cadena J modificada que lleva el scFv anti-CTLA4 (Y15J) está claramente ensamblada correctamente.

Ejemplo 2: Las IgM anti-CD20 que llevan un resto de unión scFv anti-CD3 en sus cadenas J pueden activar las células T solo en presencia de células B positivas para CD20

Este ejemplo ilustra la preparación y caracterización de una molécula de IgM que comprende una cadena J modificada. Específicamente, este ejemplo describe la preparación de la clonación molecular, expresión y purificación de un anticuerpo IgM dirigido a un antígeno de células B (CD20) y una cadena J modificada que comprende un resto de unión que se une a CD3, para demostrar la producción de una IgM biespecífica y medición de la actividad funcional en un sistema relevante. El ADN correspondiente a las secuencias de cadena pesada, ligera y J a continuación se preparó utilizando los métodos tal como se describe en el Ejemplo 1.

Secuencia de aminoácidos de secuencia de cadena ligera de IgM de un anticuerpo anti-CD20:

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWF
 QQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSN
 PPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
 ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGEC (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de aminoácidos de secuencia de cadena pesada de IgM de un anticuerpo anti-CD20:

MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV
KQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
YCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPTSSTSSVAVGCLA
QDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVV
CKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFPVRDGGFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQV
SWLREGKQVGSQVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHR
GLTFQQNASSMCVDPQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTR
QNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSEGERFTCTVTHTDLPSPKQITSR
PKGVALHRPDPVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVQVQWMQRGQPLSPEKY
VTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTG
KPTLYNVSLVMSDTAGTCY (SEQ ID NO: 7)

Secuencia de aminoácidos de la secuencia de la cadena J para V15J:

5 MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFISYTMHWV
RQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDVAV
YYCARSAYDYDGFAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVTTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLV
DNKCKCARITSRIIRSSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSLCK
KCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVET
ALTPDACYPD (SEQ ID NO: 8)

Secuencia de aminoácidos de la secuencia de la cadena J para J15V:

10 MKNHLLFWGVLAVFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSSEDPNEDIVER
NIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDS
ATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPDGGGGSGGGGSGGGG
SQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSG
GYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSAYDYDGFAYW
GQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCSASSSVSYMN
WYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWS
SNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 9)

Secuencia de aminoácidos de la secuencia de la cadena J para O15J:

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRG
YTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQ
GTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSIQVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNW
YQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWS
SNPPTFGSGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSSEDP
NEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSLCKKCDPTEVELDNQIVTATQS

NICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPDGGGSEQKLI
SEEDLNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO: 10)

Secuencia de aminoácidos de la secuencia de la cadena J para J15O:

5 QEDERIVLVDNKCKCARITSRIHRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFV
YHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYG
GETKMOVETALTPDACYPDGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSC
KASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSST
AYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGG
SQIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKLASG
VPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIKEQKLISEED
LNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO: 11)

El ADN correspondiente a estas cadenas pesadas y ligeras, así como aquel correspondiente a las secuencias de la cadena J de tipo salvaje (ts) (figura 3), cadena J para V15J o J15V mostradas a continuación se cotransfectaron en células HEK293 y proteínas expresadas y purificadas utilizando la resina de camélido tal como se describió anteriormente. Como se muestra en la figura 9, Panel A, las cuatro proteínas se expresan bien. El hexámero IgM anti-CD20 sin la cadena J claramente está resuelto de los pentámeros que contienen la cadena J para el pentámero de IgM con la cadena J de tipo salvaje, así como para la IgM biespecífica donde scFv anti-CD3 se encuentra unida a la cadena J en cualquier orientación (figura 9, Panel A).

15 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 con el software Prism. Como se muestra en la figura 9, Panel B, solo los anticuerpos que portaban el resto de unión scFv específico de CD3 en la cadena J pueden mostrar una activación dependiente de la dosis, mientras que el anticuerpo IgM que carece de la cadena J modificada o la IgG no pueden mostrar ninguna señal en este ensayo.

25 **Ejemplo 3: IgM se une mejor a dianas de baja abundancia que IgG**

Aproximadamente se cargaron 30x10³ células por pocillo en tampón FACS (2 % SFB/PBS) en una placa de fondo en V. Las placas se centrifugaron y se aspiró el sobrenadante. Se añadieron anticuerpos diluidos en serie en tampón FACS en un volumen de 50 µl a las células y se incubaron durante 30 minutos en hielo. A continuación, las células se lavaron con 150 µl de tampón FACS y luego se sedimentaron a 1200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el sobrenadante y 50 µl de secundario relevante a 1 µg/ml se añadió a cada pocillo. La placa se incubó adicionalmente durante 30 minutos en hielo. A continuación, las células se lavaron con 150 µl de tampón FACS, se sedimentaron a 1200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se aspiró el sobrenadante y se añadieron 60 µl de tampón 7-AAD FACS. (1:100). Después de una breve incubación (5 min), se adquirieron los datos, controlando las células negativas para AAD, en un calibre FACS. Se analizaron los datos de unión utilizando GraphPad Prism. Como se muestra en la figura 10, las IgM e IgG anti-PD-L1 se unen de manera comparable a las células que expresan PD-L1 alta (línea celular CHO transfectada con Promega). En una línea celular de baja expresión de PD-L1 (Arent), se observa que la IgM anti-PD-L1 se une significativamente mejor que la IgG anti-PD-L1 (más de 10X mejor en términos molares).

40 **Ejemplo 4: IgM anti-PD-L1 tiene un efecto funcional sobre la activación de células T mejor que IgG**

Los anticuerpos IgG e IgM anti-PD-L1 se caracterizaron para la activación dependiente de células B de células T utilizando una línea de células indicadoras (Promega). La activación de las células T aumenta la expresión de luciferasa dependiente de NFAT, modificada en células Jurkat. La expresión mejorada se puede medir después de la lisis usando una lectura de luminiscencia.

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 con el software Prism.

Como se muestra en la figura 11, la IgM anti-PD-L1 con o sin cadena J puede inhibir PD-L1:PD-1, interacción que conduce a la activación de la célula indicadora y aumento de la luminiscencia. También está claro que, sobre una base molar, la IgM anti-PD-L1 es capaz de activar las células T mejor que la IgG correspondiente.

Ejemplo 5: La IgM anti-PD-L1 biespecífica con scFv anti-CD3 fusionado a la cadena J puede activar las células T en presencia de células que expresan PD-L1

Este ejemplo ilustra la preparación y caracterización de una molécula de IgM que comprende una cadena J modificada. Específicamente, este ejemplo describe la preparación de la clonación molecular, expresión y purificación de un anticuerpo IgM dirigido a PD-L1 y una cadena J modificada que comprende un resto de unión que se une a CD3, para demostrar la producción de una IgM biespecífica y la medición de la actividad funcional en un sistema relevante. El ADN correspondiente a las secuencias de cadena pesada, ligera y J a continuación se preparó utilizando los métodos tal como se describe en el Ejemplo 1.

Secuencia de aminoácidos de secuencia de cadena ligera de IgM de un anticuerpo anti-PD-L1:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 106).

Secuencia de aminoácidos de secuencia de cadena pesada de IgM de un anticuerpo anti-PD-L1:

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY (SEQ ID NO: 104)

Secuencia de aminoácidos de la secuencia de la cadena J para V15J:

MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDYAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSSNPFTGGGKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLV
DNKCKCARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPD (SEQ ID NO: 108)

El ADN correspondiente a estas cadenas pesadas y ligeras, así como aquel correspondiente a las secuencias de la cadena J de tipo salvaje (ts) (figura 12), V15J descritas anteriormente se cotransfectaron en células HEK293 y proteínas expresadas y purificadas utilizando la resina de camélido tal como se describió anteriormente. Como se muestra en la figura 9, Panel A, las cuatro proteínas se expresan bien. El hexámero anti-PD-L1 sin la cadena J claramente está resuelto de los pentámeros que contienen la cadena J para el pentámero de IgM con la cadena J de tipo salvaje, así como para la IgM biespecífica donde scFv anti-CD3 se encuentra unido a la cadena J (figura 12, Panel A).

Los anticuerpos IgM anti-PD-L1 con o sin las cadenas J descritas anteriormente se caracterizaron para la liberación de la inactivación de células T dependiente de células tumorales que expresan PD-L1 usando una línea de células indicadoras (Promega). La activación de las células T aumenta la expresión de luciferasa dependiente de NFAT, modificada en células Jurkat. La expresión mejorada se puede medir después de la lisis usando una lectura de luminiscencia.

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 con el software Prism. Como se muestra en la figura 12, Panel B, la IgM anti-PD-L1 con o sin una cadena J puede inhibir PD-L1:PD-1, interacción que conduce a la activación de la célula indicadora y aumento de la luminiscencia. También está claro que la adición de la fusión de la cadena J de unión a CD3 no interfiere con la capacidad de esta IgM para bloquear la interacción PD-1:PD-L1.

Ejemplo 6: La IgM anti-PD-L1 biespecífica con scFv anti-CD3 fusionado a la cadena J puede usar células T para destruir células que expresan PD-L1

Se espera que el acoplamiento de las células B mediante anticuerpos de IgM biespecífica con una cadena J modificada aumente de gran manera la destrucción de las poblaciones de células B diana en comparación con la IgM que no porta la cadena J o la cadena J de tipo salvaje. Para evaluar la destrucción celular en el cocultivo, se realizó un ensayo de destrucción celular. Las dosis de anticuerpo se incubaron con células PD-L1+ marcadas con Oregon Green 488 (HDML2 de alta expresión o SUPHD1 de baja expresión) y células efectoras CD8+ purificadas. Tal como se muestra en la Figura 14, la IgM biespecífica que porta un scFv de unión a CD3 en su cadena J es capaz de provocar la destrucción completa de las células que expresan PD-L1. La destrucción completa de las células diana mediante IgM biespecífica se observa a concentraciones tan bajas como 2 pM.

Ejemplo 7: Se puede producir IgM anti-PD-L1 prolongada de vida media con albúmina o scFv de unión a albúmina fusionado a la cadena J y aun así bloquear la interacción PD-1:PD-L1

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. Esto es significativamente más corto que para las IgG, que interactúan con el receptor de Fc neonatal (FcRn) y se reciclan después de la endocitosis, lo que permite una vida media mucho más larga de aproximadamente 21 días. Con el fin de aumentar la vida media de nuestras IgM anti-PD-L1, se aprovecha el hecho de que se puede inmovilizar scFv a cualquiera de los extremos de la cadena J sin alterar significativamente las funciones efectoras de las IgM como CDC.

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 y col, JBC VOL. 289, NO. 19, págs. 13492-13502, 2014), péptidos (Dennis y col, J. Biol. Chem. 2002, 277:35035-35043) o scFv que pueden unirse a la albúmina de suero humano (Muller y col mAbs 4:6, 673-685; 2012),

En esta invención se proporcionan secuencias de cadena J modificadas.

La expresión y ensamblaje de esta fusión de cadena ABD-J o fusión de cadena HSA-J en IgM se ensayó usando la secuencia de IgM descrita en el Ejemplo 1 (figura 15, Panel A). Además, se verificó que la fusión de ABD o HSA a la cadena J no perturba la actividad de bloqueo de IgM anti-PD-L1 en líneas celulares diana que llevan PD-L1 en su superficie como se describe en el Ejemplo 5.

Ejemplo 8: Se puede producir IgM anti-PDL-1 (S70) con cadena J anti-CTLA-4 (Y15J) y retiene la actividad de ambos brazos

La expresión y ensamblaje de esta fusión de cadena J anti-CTLA-4 scFv (Y15J) en IgM S70 se ensayó usando la secuencia de IgM descrita en el Ejemplo 1 (figura 16, Panel A). Además, se verificó que la fusión de este scFv con la cadena J no perturba la actividad de bloqueo de IgM anti-PD-L1 en líneas celulares diana que llevan PD-L1 en su

superficie (figura 16, Panel B) como se describe en el Ejemplo 5.

Para verificar que el scFv de unión a CTLA-4 en la cadena J retiene la unión a CTLA-4, se expresó IgM anti-PDL1 biespecífica con antiCTLA4 unido al extremo amino de la cadena J en Expi293 y se purificó la afinidad mediante IgM de Capture Select como se describe en ejemplos anteriores. La proteína de fusión Fc purificada de CTLA4 humano se inmovilizó en sensores Fortebio usando química reactiva con amina en acetato de sodio a pH 6,0. La IgG anti CTLA4 (BioLegend A3.B10.G1) se une al sensor CTLA4 inmovilizado con KD de 2 nM. Las tasas de unión de scFv anti CTLA4 son similares a las de IgG. Como era de esperar, la tasa de disociación del scfv anti CTLA4 monovalente es más rápida que la de la IgG (figura 17, Paneles A y B).

Ejemplo 9: Demostración de que un anticuerpo de la superfamilia de receptores anti-TNF (DR5) puede tener actividad superagonista con una mejora espectacular sobre la IgG

La naturaleza multivalente de las moléculas de IgA o IgM presenta una herramienta útil para la aplicación a sistemas biológicos específicos en los que múltiples componentes necesariamente deben unirse simultáneamente para transmitir señales biológicas. Por ejemplo, muchas proteínas receptoras en la superficie de las células eucariotas requieren la activación simultánea de múltiples monómeros o subconjuntos para lograr la activación y transmisión de una señal biológica a través de una membrana celular, al citoplasma de la célula.

Uno de estos sistemas de receptores de proteínas de la superficie celular que requieren multimerización antes de, o según la activación, se encuentra en la superfamilia de proteínas receptoras del factor de necrosis tumoral (TNF). Dentro de esta superfamilia de proteínas receptoras hay miembros que, tras la activación, transmiten una señal al núcleo de la célula que provoca la apoptosis. Otros miembros de la familia de esta superfamilia provocan la activación de NF- κ B, de vías de apoptosis, de la quinasa regulada por señal extracelular (ERK), de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38MAPK) y de la quinasa de extremo N-terminal c-Jun (JNK). Los ejemplos no limitantes de miembros del receptor de la superfamilia del TNF que regulan la apoptosis de una célula cuando se activan son los siguientes: TNFR1 (DR1), TNFR2, CD40 (p50), Fas (CD95, Apo1, DR2), CD30, 4-1BB (CD137, ILA), TRAILR1 (DR4, Apo2), DR5 (TRAILR2), TRAILR3 (DcR1), TRAILR4 (DcR2), OPG (OCIF), TWEAKR (FN14), LIGHTR (HVEM), DcR3, DR3, EDAR, y XEDAR. (Véase, Aggarwal y col., Blood, 119:651-665, 2012).

Más particularmente, se postula que la activación de los miembros de la proteína receptora de la superfamilia del TNF mencionados anteriormente requiere que al menos tres monómeros receptores que no interactúan se reticulen, por ejemplo, mediante un ligando, para formar un trímero receptor estabilizado, lo que resulta en la transducción de señal a través de la membrana celular. Se ha observado la agrupación de estos trímeros de proteínas receptoras de la superfamilia del TNF en "balsas" de trímeros y se ha postulado que la misma conduce a una activación más efectiva de esta cascada de señalización dependiente de proteínas receptoras de la superfamilia del TNF. (Véase, Valley y col., J. Biol. Chem., 287(25):21265-21278, 2012). Se han analizado modos adicionales de activación. (Véase, por ejemplo, Lewis y col., Biophys. J., 106(6):L21-L24, 2014) (figura 12).

Secuencia de aminoácidos de secuencia de cadena pesada de IgM de un anticuerpo anti-DR5:

```
EVQLVQSGGGVERPGGSLRL SCAASGFTFD DYGMWSVVRQA PGKGLEWVSG
INWNGGSTGY ADSVKGRVTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAKIL
GAGRGWYFDL WGKGTTVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP
VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO: 12)
```

Secuencia de aminoácidos de secuencia de cadena ligera de IgM del anticuerpo anti-DR5:

```
SSELTQDPAV SVALGQTVRI TCQGDSLRSY YASWYQQKPG QAPVLVIYGK
```

NNRPSGIPDR FSGSSSGNTA SLTITGAQAE DEADYYCNSR DSSGNHVVFG
GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW
KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE
GSTVEKTVAP TECS (SEQ ID NO: 13)

Secuencia de aminoácidos de la secuencia de la cadena J de tipo salvaje:

QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFV
YHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYG
5 GETKMOVETALTPDACYPD (SEQ ID NO: 1)

El ADN correspondiente a estas cadenas pesadas y ligeras, así como aquel correspondiente a las secuencias de la cadena J de tipo salvaje (ts) se cotransfectaron en células HEK293 y las proteínas se expresaron y purificaron utilizando la resina de camélido tal como se describió anteriormente. Para probar la citotoxicidad de las proteínas purificadas, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular usando células COLO205. Brevemente, se sembraron 10 5000 células por pocillo en una placa blanca de 96 pocillos en 25 µl. Los anticuerpos se diluyeron en medio libre de rojo fenol en un volumen de 25 µl y la dilución se añadió a la placa que contenía las células. Después de incubar a 37 °C durante 24 horas, se midió la viabilidad celular usando el reactivo Cell-Titer Glo (Promega). Como se muestra en la figura 13, los anticuerpos IgM anti-DR5 e IgM+ts de la cadena J muestran un efecto citotóxico dramáticamente 15 mejorado (más de 1000 veces) en comparación con la correspondiente IgG. Esto subraya la capacidad de pentámeros/hexámeros de IgM para llevar a cabo actividad superagonista en dianas de la superfamilia de receptores de TNF.

Ejemplo 10: Anticuerpo anti-CDIM (IGM-55.5)

20 IGM-55.5 es un anticuerpo IgM humano monoclonal recombinante derivado de un anticuerpo monoclonal natural 216 aislado en la Universidad de Stanford de los esplenocitos de un paciente con linfoma no Hodgkin. HuMab 216 se usó previamente en un ensayo de fase I de leucemia linfoblástica aguda de células B y se demostró que se tolera bien con una disminución significativa de los blastos periféricos observados (Liedtke y col, Haematologica, 2012). IGM-55.5 ha 25 sido remodificado para ser más específico para un determinante de carbohidratos como un epítipo en células B humanas normales, así como linfoma de células B y linfoblastos progenitores B y, por lo tanto, para ser un potencial terapéutico para neoplasias malignas de células B avanzadas, especialmente indicado para pacientes resistentes o refractarios a rituximab. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada de IGM-55.5 se proporcionan a continuación.

30 Cadena pesada de IGM-55.5. Esta construcción de cadena pesada tiene una cadena µ de longitud completa para IGM-55.5 que une CDIM en la superficie de las células B:

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSL
KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGMAWGASVNFYWGQGLTVTVSSGSASA
PTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRRGGKYAAT
SQVLLPSKDVMQGTDEHVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFPVRDGFNPRKSK
LICQATGFSRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSM
FTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTSTKSTKLTCLVTDLTITYDSVTI
SWTRQNGEAVKTHNTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSEGERFTCTVTHTDLPSPKQTISR
PKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFWQMQRGQPLSPEKYVTSAPM
PEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMS
DTAGTCY (SEQ ID NO: 14)

35 Esta construcción de cadena pesada tiene un peso molecular de alrededor de 64 kD y cuando se expresa conjuntamente con la cadena ligera, la IgM resultante es capaz de unirse a células B positivas para CDIM.

La cadena ligera para IGM-55.5 conocida como IGM-55.5, que une CDIM (molécula que induce la muerte celular) en

la superficie de las células B:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQSYSTPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)

- 5 La construcción de cadena ligera tiene un peso molecular de alrededor de 24kD y cuando se expresa conjuntamente con la cadena pesada apropiada (SEQ ID NO: 14) es capaz de unirse a células B positivas para CDIM. IGM-55.5 se puede preparar con una cadena J modificada, como se describe en esta invención, y cualquiera de los restos de unión descritos anteriormente se puede añadir a la cadena J.

Tabla 7: Resumen de secuencias

SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
27	Rituximab VH	QVQLQQPGAEVLKPGASVMSCKASGYTFTSYNMHWVQTPGRGLEWIGAIYPGNGDT SYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSA
28	Rituximab HCDR1	SYNMH
29	Rituximab HCDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG
30	Rituximab HCDR3	STYYGGDWYFNV
31	Rituximab VL	QIVLSQSPAILLSASPGKVTMTCPASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVP VRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIKR
32	Rituximab LCDR1	RASSSVSYIH
33	Rituximab LCDR2	ATSNLAS
34	Rituximab LCDR3	QQWTSNPPT
35	900 VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT SYNMHWVQA PGKLEWVGA IYPGNGDTSY NQKFKGRFTI SVDKSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVV YYNSNYWYFD VWGQGTLLTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKQYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT
36	900HCDR3	VVYYSNSYWYFDV
37	900 VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YMHWYQQKPG KAPKPLIYAP SNLASGVPSR FSGSGGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQW SFNPPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFY PREAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSTLT TL SKADYEKHKV YACEVTHQGL
38	900LCDR1	RASSSVSYMH
39	900LCDR2	APSNLAS
40	900LCDR3	QQWFSNPPT
41	125 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKLEWVGAIYPLTGD SYNQKSKLQVTISADKSIISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSTYVGGDWQFDVWGAGTT VTVSS
42	125HCDR2	AIYPLTGDTSYNQKSKL
43	125HCDR3	STYVGGDWQFDV
44	125 VL	EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASSSVPIHWHYQQKPGQAPRLIYATSNLASGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQWLSNPPTFGQGTKEIK
45	125LCDR1	RASSSVPIH
46	125LCDR2	ATSNLAS
47	125LCDR3	QQWLSNPPT
48	844 VH #2	QVQLQQPGAEKKPGASVKVSCASGYTFTSYNMHWVQTPGRGLEWIGAIYPGNGDT SYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSA
49	844 VH #3	QVQLQQPGAEKKPGASVKVSCASGYTFTSYNMHWVQTPGRGLEWIGAIYPGNGDT SYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSA

SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
50	844 VL #5	QIVLSQSPAIITASPGKVTMTCRASTSASYIHWFQQKPTSSPKPWIYATSNLASGVP SRFSGSGSGTYSMTISSLEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
51	844 VL #5 LCDR1	RASTASASYIH
52	844 VL #6	QIVLSQSPAIITASPGKVTMTCRASTSVSYIHWFQQKPTSSPKPWIYATSNLASGVP SRFSGSGSGTYSMTISSLEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
53	844 VL #6, #7 LCDR1	RASTSVSYIH
54	844 VL #7	QIVLSQSPAIITASPGKVTMTCRASTSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVP SRFSGSGSGTYSMTISSLEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
55	844 VL #8	QIVLSQSPAIITASPGKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVP SRFSGSGSGTYSMTISSLEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
56	844 VH #10	EVQLQQSGAELKKPGASVKVSKKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPNGDT SYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSNYYGSSYWFDDVWGCTGT TVTVSS
57	844 VH #10 HCDR3	SNYYGSSYWFDDV
58	844 VL #12	DIVLTQSPAIITASPGKVTMTCRASSSVNYMDWYQKPKPGSSPKPWIYATSNLASGVP SRFSGSGSGTYSMTISSLEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
59	844 VL #12 LCDR1	RASSSVNYMD
60	844 VL #12 LCDR3	QQWTSNPPT
61	164 VH	QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYTFTSYNMHWVKQAPGQGLEWIGAIYPNGDT SYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAFYYCARSTYYGGDWYFDVWGQGT TVTVSS
62	164 VH HCDR3	STYYGGDWYFDV
63	164 VL	MGWSCIILFLVATATGVHSDIQLTQSPSSLSASVGDRTMTCRASSSVSYIHWFQQK GKAPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATYYCQQWTSNPPTF GGGKLEIK
64	1.5.3 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISKKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLWIMGIIYPGSDT RYSPTFGQQTISADKSITAYLQWSSLKASDTAMYYCARHPSYSGSGSPNFDYWGQGT LVTVSS
65	1.5.3 HCDR1	GYSTSYWIG
66	1.5.3 HCDR2	IIYPGSDTRYSPSPQG
67	1.5.3 HCDR3	HPSYSGSPNFDY
68	1.5.3 VL	DIVMTQTPPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLIYKISN RFGVDPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQATQFPLTFGGGKVEIK
69	1.5.3 LCDR1	RSSQSLVYSDGNTYLS
70	1.5.3 LCDR2	KISNRES
71	1.5.3 LCDR3	VQATQFPLT
72	ADN de región constante de IgM humana	GCCCAACCCCTTTCCGCCCTCGTCTCCTGTGAGAATTCCCGTCGGATACGAGCAGCG TGGCCGTTGGCTGCCTCGCACAGGACTTCCTTCCCGACTCCATCACTTCTCCTGGAA ATACAAGAACAACCTGACATCAGCAGCACCCGGGGCTTCCCATCAGTCTGAGAGGG GGCAAGCACGCAGCCACCTCACAGGTGCTGCTGCCTTCCAAGGACGTCATGCAGGGCA CAGACGAACACGTGGTGTGCAAAGTCCAGCACCCCAACGGCAACAAAGAAAGAACGT GCCTCTTCCAGTGATTGCTGAGCTGCCTCCCAAAGTGAGCGTCTTCGTCCACCCCGC GACGGCTTCTTCGGCAACCCCGCAAGTCCAAGCTCATCTGCCAGGCCACGGGTTC GTCCCGGCAGATTGAGGTGCTGCTGCTGCGCGAGGGGAAGCAGGTGGGGTCTGGCGT CACCACGGACAGGTGCAGGTGAGGCAAGGAGTCTGGGACCACGACCTACAAGGTG

SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
		ACCAGCACACTGACCATCAAAGAGAGCGACTGGCTCAGCCAGAGCATGTTACCTGCCC GCGTGGATCACAGGGGCTGACCTTCCAGCAGAATGCGTCTCCATGTTGGCCCCGA TCAAGACACAGCCATCCGGGTCTTCTCCATCCCCCATCTTTGCCAGCATCTTCTC ACCAAGTCCACCAAGTTGACCTGCCGTGGTCAAGACCTGACCACTATGACAGGGTGA CCATCTCTTGACCCGCCAGAATGGCGAAGCTGTGAAAACCCACACCAACATCTCCGA GAGCCACCCCAATGCCACTTTCAGCGCCGTGGGTGAGGCCAGCATCTGCGAGGATGAC TGAAGCAGACCATCTCCCGGCCAAGGGGGTGGCCCTGCACAGGCCGATGTCTACTT GCTGCCACCAGCCCGGAGCAGCTGAACCTGCGGGAGTGGGCCACCATCAGTGCCTG GTGACGGGCTTCTCTCCCGCGGACGCTCTCGTGCAGTGGATGCAGAGGGGGCAGCCCT TGTCCTCCGGAGAAGTATGTGACAGCGCCCCAATGCCCTGAGCCCCAGGCCCGAGGCCG GTACTTCGCCACAGCATCTGACCGTGTCCGAAGAGGAATGGAAACACGGGGGAGACC TACACCTGCGTGGTGGCCATGAGGCCCTGCCAACAGGGTCACCGAGAGGACCGTGG ACAAGTCCACCGGTAAACCCACCCCTGTACAACGTGTCCCTGGTCATGTCCGACACAGC TGGCACCTGCTAC
73	AA de región constante de IgM humana	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNSDISSTRGFPS VLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSF VPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVSGVTTDQVQAEAKESGPT TYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFA SIFLTKSTKLTCLVDTLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASI CEDDWSNGERFTCTVHTDLPSPKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESAT ITCLVTGFSPADVFVQWMQRQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEWN TGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
74	ADN de cadena J	ATGAAGAACCATTGCTTTTCTGGGGAGTCCCTGGCGGTTTTATTAAAGCTGTTCATG TGAAGCCCAAGAAGATGAAGGATTGTTCTTGTGACAACAAATGTAAGTGTGCCCG GATTACTTCCAGGATCATCCGTTCTTCCGAAGATCCTAATGAGGACATTGTGGAGAGA AACATCCGAATTATTGTTCTCTGAACAACAGGGAGAAATATCTCTGATCCACCTCAC CATTGAGAACCAGATTGTGTACCATTTGTCTGACCTCTGTAAAAATGTGATCCTAC AGAAGTGGAGCTGGATAATCAGATAGTTACTGCTACCCAGAGCAATCTGTGTGAA GACAGTGTACAGAGACCTGTACACTTATGACAGAAACAAGTGTACACAGCTGTGG TCCCACTCGTATATGTTGGTGGAGACCAAAATGTTGGAACAGCCCTTAACCCAGATGC CTGCTATCTGACTAA
75	AA de cadena J	MKNHLLFWGVLAFFIKAVHVKAQEDERIVLVNCKKCARITSRIIRSSDPNEDIVER NIIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDED SATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD
76	aminoácido CD20 humano	MTTPRNSVNGTFFAEPMKGPLAMQSGPKPLFRMSSLVGPQTQSFPMRESKTLGAVQIM NGLFHIALGGLLMI PAGLYA2ICVTVWYPLWGGIMYIIISGLLAATEKNSRKCLVKGK MIMNSLSLFAAISGMILSIMDILNLIKISHFLKMESLNFIRAHTPYININCEPANPSE KNSPSTQYCYSIQSLFLGLLSVMLIFAFQELVIAGIVENEWKRTCSRPAKSNIVLLSA EEKKEQTIIEIKEEVVLGTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEEETETNFPPEPPQDQESSP LENDSSP
77	Ritux-ADN de cadena pesada de IgM	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCCGAGCTGGTCAAACCTGGCGCTAGTGTAAAA TGTTCATGCAAGGCATCCGGATACACATTCACTAGCTATAACATGCACCTGGGTGAAGCA GACCCCGGCAGGGTCTGGAGTGGATCGGAGCTATCTACCCCGGCAACGGAGACACA TCTTATAATCAGAAGTTTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGTCCAGCTCTA CCGCATACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGCGAGGACTCCGCCGTGTACTATTGCGC CCGGTCCACTTACTATGGCGGAGATTGGTATTTCAATGTGTGGGGAGCAGGCACCACA GTCACCGTCTCGAGCGGAGTGTCTAGCGCCCCAACCTTTTCCCCCTCGTCTCTGTG AGAATTCCCGCTCGGATACGAGCAGCGTGGCGTTGGCTGCCTCGCACAGGACTTCCT TCCGACTCCATCACTTTCTCTGGAATAACAAGAACACTCTGACATCAGCAGCACC CGGGGCTTCCCATCAGTCTTGAGAGGGGGCAAGTACGAGCCACCTCACAGGTGCTGC TGCTTCCAAGGACGTCATGCAGGGCACAGCAACACGTGGTGTGCAAGTCCAGCA CCCCAACGGCAACAAAGAAAAGAACGTGCCTCTTCCAGTGATGTGTGAGCTGCCTCCC AAAGTGAGCGTCTTCTGTCACCCCGCGACGGCTTCTTCGGCAACCCCGCAAGTCCA

SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
		AGCTCATCTGCCAGGCCACGGGTTTCAGTCCCCGGCAGATTTCAGGTGTCTTGGCTGCG CGAGGGGAAGCAGGTGGGGTCTGGCGTCACCACGGACCAGGTGCAGGCTGAGGCCAAA GAGTCTGGGCCCACGACCTACAAGGTGACCAGCACACTGACCATCAAAGAGAGCGACT GGCTCAGCCAGAGCATGTTACCTGCCGCGTGGATCACAGGGGCTGACCTTCAGCA GAATGCGTCTCCATGTGTGTCCCCGATCAAGACACAGCCATCCGGGTCTTCGCCATC CCCCCATCCTTTGCCAGCATCTTCTCACCAAGTCCACCAAGTTGACCTGCCTGGTCA CAGACCTGACCACCTATGACAGCGTGACCATCTCCTGGACCCGCCAGAATGGCGAAGC TGTGAAAACCCACACCAACATCTCCGAGAGCCACCCCAATGCCACTTTCAGCGCGGTG GGTGAGGCCAGCATCTGCGAGGATGACTGGAATTCCGGGGAGAGGTTACGTGCACCG TGACCCACACAGACCTGCCCTCGCCACTGAAGCAGACCATCTCCCGGCCCAAGGGGT GGCCTGCACAGGCCCGATGTCTACTTGTGCTGCCACAGCCGGGAGCAGCTGAACCTG CGGGAGTCGGCCACCATCACGTGCCGTGGTGACGGGCTTCTCTCCCGGCAGCTCTCG TGCACTGGATGCAGAGGGGGCAGCCCTTGTCCCGGAGAAGTATGTGACAGCGCCCC AATGCCCTGAGCCCCAGGCCCGAGGCCGCTACTTTCGCCACAGCATCTTACCGTGTCC GAAGAGGAATGGAACACGGGGGAGACCTACACCTGCGTGGTGGCCCATGAGGCCCTGC CCAACAGGTCACCGAGAGGACCGTGACAAGTCCACCGGTAACCCACCCTGTACAA CGTGTCCCTGGTCACTGTCCGACACAGCTGGCACCTGCTACTGA
78	Ritux-AA de cadena pesada de IgM	QVQLQOPGASLVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKOTPGRGLEWIGATYPNGDT SYNQKFKGRATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNDSISST RGFPSPVLPGGKYAATSQVLLPSKDVMOGTDDEHVVKVQHNPNGNKEKNVLPVLAELPP KVSFVFPVRDGGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVSGVTTDQVQAEAK ESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRLTFQONASSMCPVDDTAIRVFAI PPSFASIFLTAKSTKLTLCLVDTLTYYDSVTISWTRQNGEAVKTHNISESHPNATFSAV GEASICEDDWNNGERFTCTVHTDLPSPLKQTI SRPKGVALHREDVYLLFPAREQLNL RESATITCLVTGFS PADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEQAPGRYFAHSILTVS EEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY-
79	Ritux-ADN de cadena ligera	CAAAATGTGCTGTCTCAGAGTCCAGCTATCCTGAGCGCATCTCCCGGAGAGAAGGTGA CCATGACATGCAGAGCCTCCAGCTCTGTCTCCTACATCCACTGGTTCAGCAGAAGCC CGGCTCCTCCCAAACCTTGGATCTACGCCACCTCTAACCTGGCTAGTGGTGTGCCT GTCAGGTTTAGTGGATCAGGGTCCGGCACCAGCTACTCTCTGACAATCAGCCGGGTGG AGGCTGAAGACGCCCTACATACTATTGCCAGCAGTGGACTCTAATCCCCCTACCTT CGGCGGAGGGACAAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTGTGCTGCTGA ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC AGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG TTAG
80	Ritux-AA de cadena ligera	QIVLSQSPAILSASPGKVTMTCRASSSVSYIHWFQKPKGSSPKPWIYATSNLASGVP VRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNNEYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL SSTLTLSKADYEKHRVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
81	1.5.3-ADN de cadena pesada de IgM	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGAGTCCCTGAAGA TCTCCTGCAAGGGCTCCGGCTACTCCTTACCTCCTACTGGATCGGCTGGGTGAGGCA GATGCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCATCATCTACCCCGGCGACTCCGACACC AGGTACTCCCCCTCCTTCCAGGGCCAGGTGACCATCTCCGCCGACAAGTCCATCACC CCGCCTACCTGCAGTGGTCTCCTTGAAGGCCTCCGACACCGCCATGTACTACTGCGC CAGGCACCCCTCCTACGGCTCCGGCTCCCCCAACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACCGTGTCTCCGGCAGTGCTAGCGCCCCAACCCCTTTTCCCCTCGTCTCCT GTGAGAATTCCCCGTGGATACGAGCAGCGTGGCCGTGGCTGCCTCGCACAGGACTT CCTTCCCGACTCCATCACTTCTCCTGGAAATACAAGAACAACCTTGACATCAGCAGC ACCCGGGGCTTCCATCAGTCTGAGAGGGGGCAAGTACGACGCCACCTCACAGGTGC TGCTGCCTTCCAAGGACGTATGCAGGGCACAGACGAACACGTTGGTGTGCAAAGTCCA GCACCCCAACGGCAACAAAGAAAAGAACGTGCTCTTCCAGTGATTGCTGAGCTGCCT

SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
		CCCAAAGTGAGCGTCTTCGTCCACCCCGGACGGCTTCTTCGGCAACCCCGCAAGT CCAAGCTCATCTGCCAGGCCACGGGTTCAGTCCCCGGCAGATTACAGGTGTCTGGCT GCGCGAGGGGAAGCAGGTGGGGTCTGGCGTCACCACGGACAGGTGCAGGCTGAGGCC AAAGAGTCTGGGCCCACGACCTACAAGGTGACCAGCACACTGACCATCAAAGAGAGCG ACTGGCTCAGCCAGAGCATGTTACCTGCCGCTGGATCACAGGGGCTGACCTTCCA GCAGAATGCGTCCTCCATGTGTGTCCCGCATCAAGACACAGCCATCCGGGTCTTCGCC ATCCCCCATCTCTTGCCAGCATCTCTCTACCAAGTCCACCAAGTTGACCTGCCTGG TCACAGACCTGACCACCTATGACAGCGTGACCATCTCTGGACCCGCCAGAAATGGCGA AGCTGTGAAAAACCCACACCAACATCTCCGAGAGCCACCCCAATGCCACTTTCAGCGCC GTGGGTGAGGCCAGCATCTGCGAGGATGACTGGAATTCGGGGGAGAGGTTACAGTGCA CCGTGACCCACACAGACCTGCCCTCGCCACTGAAGCAGACCATCTCCGGCCCCAAGGG GGTGGCCCTGCACAGGCCGATGTCTACTTGCTGCCACAGCCCGGGAGCAGCTGAAC CTGCGGGAGTCGGCCACCATCAGTGCCTGGTGACGGGCTTCTCTCCCGGGACGCTCT TCGTGCACTGGATGACAGAGGGGGCAGCCCTGTCCCCGGAGAAGTATGTGACCAAGCGC CCCAATGCCTGAGCCCCAGGCCCGGCTACTTCCGCCACAGCATCTGACCGTGC TCCGAAGAGGAATGGAACACGGGGGAGACCTACACCTGCGTGGTGGCCCATGAGGCC TGCCCAACAGGGTCACCGAGAGGACCGTGGACAAGTCCACCGGTAAACCCACCTGT CAACGTGTCTCTGGTCATGTCCGACACAGCTGGCACCTGCTACTGA
82	1.5.3-AA de cadena pesada de IgM	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGLIYPGSDST RYSPFQGGVITISADKSIITAYLQWSSLKASDTAMYCARHPSTYSGSGSNFDYWGQGT LVTVSSGSAAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWYKNNSDISS TRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMOGTDHVVCKVQHPNGNKERNVPLPVIAELP PKVSVFVPPRDGFFGNPRKSLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEA KESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRLTFQONASSMCPVDDTAIRVFA IPPSFASIFLTAKSTKLTCLVTLTYDSVTISWTRQNGEAVTHTNIBESHNPATFSA VGEASICEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQTISSRPGVALHRPDPVYLLPPAREQLN LPESATITCLVTGFSADVFQWMQRCQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTV SEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTEPTVDKSTGKPTLYNVSIVMSDTAGTCY-
83	1.5.3-ADN de cadena ligera de IgM	GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGTCTCCCCCGTGACCTGGGCCAGCCCGCT CCATCTCTGCAGGTCTCTCCAGTCCCTGGTGTACTCCGACGGCAACACCTACCTGTC CTGGCTGCAGCAGAGGCCCGCCAGCCCCCAGGCTGCTGATCTACAAGATCTCCAAC AGGTCTCTCCGGCGTGCCCGACAGGTCTCTCGGCTCCGGCGCCGGCACCAGCTTACCCC TGAAGATCTCCAGGTTGAGAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGTGACGCCAC CCAGTTCCTCCCTGACCTTCGGCGCGCGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCT GCACCATCTGTCTTATCTCTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCT CTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC'TCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC ACAAGTCTACGCC'TGCGAAGT'CACCATCAGGGCC'TGAGCTCGCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTAG
84	1.5.3-AA de cadena ligera de IgM	DIVMTQTPLESFVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLIIYKISN RFSGVPPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCVQATQFPLTFGGGTKEIKRTVA APSVFIAPPSEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC-
85	aa de región constante de IgA1 humana P01876	ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGGFFPQEPPLSVTWSESGQGVARNFPPSQD ASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPPSTPPTSPSTPP TSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVFTTWTSPSGKSAVQGP PERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHL LPPPSEELALNELVLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTVASRQEPESQGT TFAVTSILRVAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVMAEV DGTCY

SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
86	aa de región constante de IgA2 P01877	ASPTSPKVFPLSLDSTPDQGNVWVACLVGGFFPQEP LSVTWSESGONVIARNFPFSQD ASGDLYTTSSQLTLPATQC PDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVP CPVPPPPPCCHPRLSL HRPALEDLLLGSEANITCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPEPDL CGCYSVSS VLPGCAQPNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNEL VTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYL TWASRQEPSQGTTF TFAVTSILRVAEE DWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTI DRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
87	Precursor del componente de secreción humano	MLLFVLTCLLAVFPAISTKSPIFGP EEVNSVEGNSV SITCYYPPTSVNRHTRKYWCRQ GARGGCITLISSEGYVSSKYAGRANLTNFPENGTFV VVNIAQLSQDDSGRYKCGLGINS RGLSFDVSLEVSQGPGLLNDTKVYTVDLGRVTINCPFKTEN AQKRKSLYKQIGLYPV LVIDSSGYVNPNTGRIRLDIQGTGQLLF SVVINQLRLSDAGQYLCQAGDDSN SNKKN ADLQVLKPEPELVYEDLRGSVTFHCA LGPEVANVAKFLCRQSSGENCDVVVNTLGKRA PAFEGRILLNPQDKDGSF SVVITGLRKEDAGRYLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNE ESTIPRSPTVVKGAVAGGSVAVLCPYNRKESKSIKYWCLWEGAQNGRCPLLVDS EGWVK AQYEGRLSLL EEPNGTFTVILNQLTSRDAGFYWCLTNGDTLWRTTVEIKIIEGEPNL KVPGNVTAVLGETLKVPC HFPCFSSYEKYWCKWNN TGCQALPSQDEGPSKAFVNCDE NSRLVSLTLNLVTRADEGWYCGVKQGHFYGETAAVYVAVEERKAAGSRDVS LAKADA APDEKVLDSGFR EIEENKAIQDPRLFAEEKAVADTRDQADGSRASVDSGSSEEQGGSSR ALVSTLVPLGLVLAVGAVGVARARHRKNVDRVSI RSYRTDISMSDFENSREFGAND NMGASSITQETSLGGKEEFVATTESTTETKEPKKAKRSSKEEAEMAYKDFLLQ SSTVA AEAQDGPQEA
88	Componente de secreción humano maduro	KSPIFGP EEVNSVEGNSV SITCYYPPTSVNRHTRKYWCRQ GARGGCITLISSEGYVSS KYAGRANLTNFPENGTFV VVNIAQLSQDDSGRYKCGLGINSRGLSFDVSLEVSQGPGLL NDTKVYTVDLGRVTINCPFKTEN AQKRKSLYKQIGLYPV LVIDSSGYVNPNTGRIR LDIQGTGQLLF SVVINQLRLSDAGQYLCQAGDDSN SNKKNADLQVLKPEPELVYEDLR GSVTFHCA LGPEVANVAKFLCRQSSGENCDVVVNTLGKRAPAFEGRILLNPQDKDGSF SVVITGLRKEDAGRYLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPRSPTVVKGAVAGGS VAVLCPYNRKESKSIKYWCLWEGAQNGRCPLLVDS EGWVK AQYEGRLSLL EEPNGTFT TVILNQLTSRDAGFYWCLTNGDTLWRTTVEIKIIEGEPNLKVPGNVTAVLGETLKVPC HFPCFSSYEKYWCKWNN TGCQALPSQDEGPSKAFVNCDE NSRLVSLTLNLVTRADEG WYWCGVKQGHFYGETAAVYVAVEERKAAGSRDVS LAKADAAPDEKVLDSGFR EIEENKA IQDPR
89	J15ABD ADN	ATGGAATGGAGCTGGGTCTTCTCTCTTCTCTGT CAGTAACGACTGGTGTCCACTCCC AGGAAGATGAGCGGATCGTGCTGGTGGACAACAAGTGCAAGTGC GCCCGGATCACCTC CCGGATCATCCGGTCTCCGAGGATCCCAACGAGGACATCGTGAACCGGAACATCAGA ATCATCGTGCCCTGAACAACCGCGAGAACATCTCCGACCCACCAGCCCTCTGCGGA CCAGATTCTGTACCACTGTCCGACCTGTGCAAGAAAGTGCGACCCCTACCAGAGTGGA ACTGGACAACAGATCGTGACCGCCACCCAGTCCAACATCTGCGACGAGGACTCCGCC ACCGAGACATGCTACACCTACGACCGGAACAAGTGCTACACCGCCGTGGTGCCCTTG TGTACGGCGGCGAGACAAAGATGGTGGAAACCGCCCTGACCCCGACGCTGTATCC TGATGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGTGGTCTGCGGAGAGGGGCTCTCAGCAGCAT GAGGCCGTGGACGCCAATTCTCTGGCCGAGGCTAAGGTGCTGGCCAACAGAGAGCTGG ATAAGTACGGCGTGTCCGACTACTACAAGAACCTGATCAACAACGCCAAGACCGTGGA AGGCGTGAAGGCCCTGATCGACGAGATCCTGGCTGCCCTGCCCTTGA
90	J15ABD AA	MEWSWVFLF LSVTTGVHSGEDERIVLV DNKCKCARITSRIIRSS EDPNEDIVERNIR LIVPLNNRENISDPTSP LRTFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSA TETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALT PDACYPDGGGSGGGGSGGGGSGHD EAVDANSLAZAKVLANREL DKYGVSDYYKNL INNAKTVEGVKALIDEILAALP
91	ABD15J ADN	ATGGAATGGAGCTGGGTCTTCTCTCTTCTCTGT CAGTAACGACTGGTGTCCACTCCC AGCACGATGAGGCCGTGGACGCCAATTCTCTGGCCGAGGCTAAGGTGCTGGCCAACAG AGAGCTGGATAAGTACGGCTGTCCGACTACTACAAGAACCTGATCAACAACGCCAAG ACCGTGAAGGCGTGAAGGCCCTGATCGACGAGATCCTGGCTGCCCTGCCTGGAGGCG GAGGATCTGGTGGCGGTGGTCTGCGCGAGGGGCTCTCAGGAAGATGAGCGGATCGT GCTGGTGGACAACAAGTGCAAGTGC GCCCGGATCACCTCCCGGATCATCCGGTCTCC GAGGATCCCAACGAGGACATCGTGAACGGAACATCAGAATCATCGTGCCCTGAACA

SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
		ACCGCGAGAACATCTCCGACCCACCAGCCCTCTGCGGACCAGATTCTGTGTACCACCTGTCCGACCTGTGCAAGAAAGTGCAGACCTACCGAGGTGGAACCTGGACAACCAGATCGTGTACCGCCACCCAGTCCAACATCTGCGACGAGGACTCCGCCACCGAGACATGCTACACCTACGACCGGAACAAGTGCTACACCGCCGTGGTGCCTCTGGTGTACGGCGCGAGAGACAAATGATGGTGGAAACCGCCCTGACCCCGACGCCCTGCTATCCTGATTGA
92	ABD15J AA	MEWSWVFLFPLSVTTGVHSCHEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAAALPGGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLVNKKCARITSRIRSSIEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTFEVLNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMYETALTPTDACYPP
93	HSA15J ADN	ATGAAATGGGTACCTTTATCTCCCTGCTGTTCCTGTCTCTCTCCGCCCTACTCTCGGGCGGTGTTCAGAAGAGACGCCACAAATCGGAGGTAGCGCACCGGTTCAAAGACTTGGGAGAAGAAAACCTTTAAGGCCCTGTACTCATTCGCTTTGCGCAGTATTTGCAGCAGTGCATTCGAGGACCATGTCAAACCTGTCAACGAAGTGACAGAGTTTGCAGAACTTGCCTCGCGGACGAATCCGCGGAGAACTGTGACAAAGTCGCTGCATACGTTGTTCGGGGATAAGCTCTGTACCGTAGCGACCTTGAGGGAAACTTACGGGGAAATGGCGGACTGTTGCGCTAAGCAGGAGCCGGAACGGAACGAGTGTTCCTTCAGCATAGGATGACAACCCCAACCTCCCTAGATTGGTCAGACCCGAAAGTGAGTGTGATGTGCACAGCATTCATGACAAATGAGAAACCTTTCTCAAAAAGTATTTGTACGAGATTGCCCGACGACACCCCTATTTCTACGCTCCCGAGTTGCTCTTCTTCGCGAAACGGTATAAAGCTGCCTTTACTGAATGCTGTC AAGCAGCGGACAAGGCCGATGCCTCCTTCCCAAATGGATGAATCCCGCATGAAGGGAAGGCGTCATCGGCCAAACAGCGGCTTAAGTGCGCATCGCTTCAGAAATTCGAGAGAGGGCGTTCAAAGCGTGGGCCGTGCGGAGACTGTGCGAGAGATTCCCTAAGCGGAATTTGCGAGAGGTATCGAAGCTCGTGACAGACCTCACAAAGGTCCACACCGAATGTTGCCATGGAGACCTGCTTGAGTGCGCCGATGATAGGGCAGACCTCGCAAAGTACATTTGTGAG AATCAGGACAGCATTAGCTCCAAGCTGAAAGAGTGCTGTGAGAAGCTTTGCTGGAAA AATCCCACTGTATCGCCGAGGTAGAAAACGATGAAATGCCCGCTGATCTTCCCTCGCTGGCGGCAGACTTCGTTCGAGTCGAAGGACGCTTGCAAGAATTACGCAGAGGCAAAAGATGTGTTTCTTGAATGTTCTTTATGAGTATGCGAGAAGGCACCCGGATTATTCCTGTG TACTGCTCTGCGATTGCGGAAAACGTACGAAACAACGCTTGAGAAGTTGTTGTCGGCTGCGCGACCCGCATGAGTGCTACGCCAAGGTATTTGATGAGTTTAAACCTCTTGTGCGAGGAACCCAGAAATCTTATCAAGCAGAACTGCGAGCTTTTCAAGCAGTTGGGTGAATACA AATTCAGAACCGCGCTTCTGGTGAGGTATACCAAGAAAGTACCTCAAGTCTCAACACC CACACTCGTCGAGGTGTACGGAACCTCGGGAAAGTAGGGTCGAAGCTGTGTAACAC CCAGAGGCCAAGCGCATGCCCTGTGCGGAGGACTACCTCTCGGTAGTGTGAATCAAC TGTGTGTCTCCACGAAAAGACGCCGTGTGAGACCGCGTCACAAAGTGTGTCAGCGGA GAGCCTGGTCAATAGACGCCCTGCTTCTCAGCGCTGGAGGTGGATGAGACATACGTC CCGAAAGAGTTTAAAGCCGAAACGTTTACTTTTCATGCTGATATCTGTACGTTGTGAG AGAAGGAAAGGCAAAATCAAGAAACAACTGCGCTTGTGGAAGTGGTGAAACACAAACC GAAGGCGACTAAGGAACAGCTGAAGGCGGTGATGGATGACTTTGCCCGCTTCGTAGAG AAATGCTGTAAAGCAGACGATAAGGAGACTTGT'TTTCGGAAGAGGGACCTAAACTTG TTGCTGCAAGTCAAGCTGCCCTTAGGCTTAGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGTGGTTC TGCGGAGGGGGCTCTCAGGAAGATGAGCGGATCGTGCTGGTGGAACAAGTGCAAG TGCGCCCGGATCACCTCCCGGATCATCCGGTCTCCGAGGATCCCAACGAGGACATCG TGGAACGGAACATCAGAATCATCGTGCCCTGAACAACCGCGAGAACATCTCCGACCC CACCAGCCCTCTGCGGACCAGATTGCTGTACCACCTGTCCGACCTGTGCAAGAAGTGC GACCTACCGAGGTGGAAGTGGACAACCAGATCGTGACCGCCACCCAGTCCAACATCT GCGACGAGGACTCCGCCACCGAGACATGCTACACCTACGACCGGAACAAGTGTACAC CGCCGTGGTGCCTCTGGTGTACGGCGCGAGACAAAGATGGTGGAAACCGCCCTGACC CCGACGCCCTGCTATCCTGATTAG
94	HSA15J AA	MKMVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLOQC PFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECTLQHKDDNPNLPRLVPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHFFYF APELLFFAKRYKAAATECCQAADKAACL LPKLELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFG E RAFP KAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDILLECADDRAADLAKYICE NQDSISSKLECKEKLLEKSHCIAEVENDENPADLPSLAADPVESKDVCNKYAEAKD

SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
		VFLGMFLYEYARRHPDYSVVLILLRLAKTYETTLKCCAAADPHECIYKVFDEPKPLVE EPQNLIKQNCCLFKQNGEYKFNALLVRYTKRVPOVSTPTLLVEVSRNIGKVGSKCKH PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYV PK2FNAETFTFHADICTLSKEROIKKQATLVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCCKADDKETCFAEFGPKLVAASQAALGLGGGGSGGGSGGGSGQEDERIVLVONKCK CARITSRIIRSSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKC DPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMETALT PDACYPD
95	J15HSA ADN	ATGAAGAACCATCTGCTGTTCTGGGGCGTGCTGGCCGTGTTTCATCAAGGCCGTGCACG TGAAGGCCAGGAAGATGAGCGGATCGTGCTGGTGGACAACAAGTGCAAGTGCCCCG GATCACCTCCCGGATCATCCGGTCTCCGAGGATCCCAACGAGGACATCGTGGAACGG AACATCAGAATCATCGTGCCCTGAACAACCGCGAGAACATCTCCGACCCACGACCC CTCTGCGGACCAGATTCTGTACACCTGTCCGACCTGTGCAAGAAGTGCGACCCCTAC CGAGGTGGAAGTGGACAACGAGATCGTGACCGCCACCCAGTCCAACATCTGCGACGAG GACTCCGCCACCGAGACATGCTACACCTACGACCGGAACAAGTGCTACACCGCCGTGG TGCCCTCTGGTGTACGGCGGCGAGACAAAGATGGTGGAACCGCCCTGACCCCGACGC CTGCTATCCTGATGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGTGGTTCTGGCGGAGGGGGCTCT GACGCCACAAATCGGAGGTAGCGCACCGGTTCAAAGACTTGGGAGAAGAAAACCTTTA AGGCCCTTGTACTCATTTGCGTTTGGCGAGTATTTGCGAGAGTCCCATTCGAGGACCA TGTCAAACCTTGTCAACGAAGTGACAGAGTTTGCAGAACTTGGCTCGCCGACGAATCC GCGGAGAACTGTGACAAGTCGCTGCATACGTTGTTGCGGGATTAAGCTCTGTACGCTAG CGACCTTGAGGGAACTTACGGGGAAATGGCGGACTGTGCGCTAAGCAGGAGCCGGA ACGGAACGAGTGTTCCTTCAGCATAGGATGACAACCCCAACCTCCCTAGATTGGTTC AGACCCGAAGTGGATGTGATGTGCACAGCATTCATGACAATGAGGAAACCTTTCTCA AAAAGTATTTGTACGAGATTGCCCGACGACACCCCTATTTCTACGCTCCCGAGTTGCT CTTCTTCGCGAAACGGTATAAAGCTGCCTTTACTGAATGCTGTCAAGCAGCGGACAAG GCCGCATGCCTCCTTCCCAAATTGGATGAATCCGCGATGAAGGGAAGGCGTCATCGG CCAAACAGCGGCTTAAGTGCGCATCGCTTCAGAAATTCGGAGAGAGGGCGTTCAAAGC GTGGGCGTCGCGAGACTGTGCGAGAGATTCCCTAAGGCGGAATTTGCGAGAGGTATCG AAGCTCGTGACAGACCTCACAAAGGTCCACACCGAATGTTGCCATGGAGACCTGCTTG AGTGCGCCGATGATAGGGCAGACCTCGCAAAGTACATTTGTGAGAATCAGGACAGCAT TAGTCTCAAAGCTGAAAGAGTGCTGTGAGAAGCCTTTGCTGGAAAAATCCCAGTGTATC GCCGAGGTAGAAAAACGATGAAATGCCGCTGATCTTCCCTCGCTGGCGGACAGTTGCTG TCGAGTCGAAGGACGCTGTGCAAGAATTACGCGAGAGGCAAAAGATGTGTTTCTTGAAT GTTCTTTATGAGTATGCGAGAAGGCACCCGATTATTCGCTGGTACTGCTCTTGCGA TTGGCGAAAACGTACGAAACAACGCTTGAGAAGTGTGTGCGGCTGCCGACCCGCATG AGTGCTACGCCAAGGTATTTGATGAGTTTAAACCTCTTGTGAGGAAACCCAGAATCT TATCAAGCAGAACTGCGAGCTTTTCAAGCAGTTGGGTGAATACAAATTCAGAACCGG CTTCTGGTGAGGTATACCAAGAAAGTACCTCAAGTCTCAACACCCACACTCGTCGAGG TGTCACGGAACCTCGGGAAGTAGGGTCGAAGTGCTGTAAACCCAGAGGCCAAGCG CATGCCCTGTGCGGAGGACTACCTCTCGGTAGTGTGAATCAACTGTGTGCTCTCCAC GAAAAGACGCCGCTGTGAGACCGCGTCACAAAGTGCTGCACGGAGAGCCTGGTCAATA GACGCCCTGTCTCAGCGCTGGAGGTGGATGAGACATACGTCCTGAAAGAGTTTAA CGCCGAAACGTTTACTTTTTCATGCTGATATCTGTACGTTGTGAGAGAAGGAAAGGCAA ATCAAGAAACAACTGCGCTTGTGGAAGTGGTGAAGCACAACCCGAAGGCGACTAAGG AACAGCTGAAGGCGGTGATGGATGACTTTGCCGCGTTGCTAGAGAAATGCTGTAAAGC AGACGATAAGGAGACTTGTTTTGGGAAGAGGGACCTAAACTTGTGCTGCAAGTCAA GCTGCCTTAGGCTTATAG
96	J15HSA AA	MXNHLLFWGVAVFIKAVHVKAQEDERIVLVONKCKCARITSRIIRSSSEDPNEDIVER NIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDE DSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMETALTDPACYPDGGGGSGGGSGGGGS DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCTVADES AENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPRLV RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLEFAKRYKAATTECCQAADK AACLLPKLDELDEGRASSAKQRLKCAASLQKEGERAFKAWAVARLSQREFKAEPAEVS

SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
		KLVTDLTKVHTECHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEAPLLEKSHCI AEVENDEMPADLPSLAADTVESKDVCKANYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLILA LAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVTFDEPKPLVEEPQNLIKQNCLEFKQLGEYKQNA LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH EKTVPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQ IKKQTAALVELVKHKPKATKQQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEZGPKLVAASQ AALGL
97	V15J15ABD ADN	ATGGGGTGGTCTACATTATCCTGTTCTCGTGGCCACCGCCACTGGCGTGCACAC AGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGT GTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCATCAGCTACACCATGCACCTGGGTGCACAG GCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGTACATCAACCTTAGATCTGGCTACACCC ACTACAACCAGAAGCTGAAGGACAAGGCCACCTGACCGCCGACAAGTCTGCCCTCCAC CGCTACATGGAACGTCTCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC AGATCCGCCTACTACGACTACGACGGCTTCGCCTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGA CAGTGTCTAGCGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTAGTGGCGGTGGCGGATCTGA TATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTGCCCTCTGTGGGCGACAGTGTGACA ATTACCTGCTCCGCCAGCTCCTCCGTGTCTTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCCAAGCGGCTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCTGGCGTGCCTTC CAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCTGACCATCAGTCCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCTTCCACCTTTG CGGAGGCCACCAAGTGGAAATCAAAGGCGGCGGAGGAAGCGGGGAGGCGGTCTGG GGGTGGTGGATCTCAGGAAGATGAGCGGATCGTGTGGTGGACAACAAGTGAAGTGC GCCCGGATCACCTCCCGGATCATCCGTCTCCGAGGATCCCAACGAGGACATCGTGG AACGGAACATCAGAATCATCGTGGCCCTGAACAACCGCGAGAATCTCCGACCCAC CAGCCCTCTGCGGACACAGATTCTGTGTACCACTGTCCGACTCTGCAAGAGTGGAC CTTACCGAGGTGGAACCTGGACAACAGATCGTGACCGCCACCCAGTCCAACATCTGCG ACGAGGACTCCGCCACCGAGACATGCTACACCTACGACCGGAACAAGTGTACACCGC CGTGGTGCCTCTGGTGTACGGCGGCGAGACAAAGATGGTGGAAACCGCCCTGACCCCT GACGCTGTATCTGATGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGTGGTCTTGGCGGAGGGG GCTCTCAGCAGATGAGGCCGTGGACGCCAATTCTCTGGCCGAGGCTAAGGTGCTGGC CAACAGAGAGCTGGATAAGTACGGCTGTCCGACTACTACAAGAACCTGATCAACAAC GCCAAGACCGTGGAAAGCGTGAAGGCCCTGATCGACGAGATCCTGGCTGCCCTGCCTT GA
98	V15J15ABD AA	MGWSYIILFLVATATGVHSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQ APGGGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDYAVYYCA RSAYYDYDGFAYWGGTTLVTSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSLSASVGRVT ITCSASSSVSYMNWYQKPKRKRLLIYDTSKLASGVPSRPSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDPATYYCQWSSNPPTFGGCTKVEIKGGGGSGGGSGGGGSGQEDERIVLVNKKCK ARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCD PTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGTQKMTALTP DACYPDGGGGSGGGSGGGGSGHDEAVDANSLAEAKVLNRELDKYGVSDYYKNLINN AKTVEGVKALIDEILAALP
99	V15J15HSA(K573P) ADN	ATGGGGTGGTCTACATTATCCTGTTCTCGTGGCCACCGCCACTGGCGTGCACAC AGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGT GTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCATCAGCTACACCATGCACCTGGGTGCACAG GCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGTACATCAACCTTAGATCTGGCTACACCC ACTACAACCAGAAGCTGAAGGACAAGGCCACCTGACCGCCGACAAGTCTGCCTCCAC CGCTACATGGAACGTCTCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC AGATCCGCCTACTACGACTACGACGGCTTCGCCTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGA CAGTGTCTAGCGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTAGTGGCGGTGGCGGATCTGA TATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTGCCCTCTGTGGGCGACAGATGACA ATTACCTGCTCCGCCAGCTCCTCCGTGTCTTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCCAAGCGGCTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCTGGCGTGCCTTC CAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCTGACCATCAGTCCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCTTCCACCTTTG

SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
		GGGAGGCCACCAAGGTGGAAATCAAAGGCGGCGGAGGAAGCGGGGAGGCGGTTCTGG GGGTGGTGGATCTCAGGAAGATGAGCGGATCGTGTGGTGGACAACAAGTGCAAGTGC GCCCAGGATCACCTCCCGGATCATCCGGTCTCCGAGGATCCCAACGAGGACATCGTGG AACGGAACATCAGAATCATCGTGCCCTGAACAACCGGAGAGAACATCTCCGACCCAC CAGCCCTCTGCGGACCAGATTCTGTGTACACCTGTCCGACCTGTGCAAGAAGTGCAC CCTACCGAGGTGGAAGTGGACAACCAGATCGTGACCGCCACCCAGTCCAACATCTGCG ACGAGGACTCCGCCACCGAGACATGCTACACCTACGACCGGAACAAGTGTACACCGC CGTGGTGCCTCTGGTGTACGGCGGCGAGACAAGATGGTGGAAACCGCCCTGACCCCC GACGCTGTATCCTGATGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGTGGTCTTGGCGGAGGGG GCTCTGACGCCCACAAATCGGAGGTAGCGCACCAGTTCAAAGACTTGGGAGAAGAAAA CTTTAAGGCCCTTGTACTCATTCGCTTTGCGCAGTATTTGCAGCAGTGCCCATTCGAG GACCATGTCAAACCTGTCAACGAAGTGACAGAGTTTGCAGAAACTTGGCTCGCCGAGC AATCCGCGGAGAACTGTGACAAGTCGCTGCATACGTTGTTCCGGGATAAGCTCTGTAC CGTAGCGACCTTGAGGGAACTTACGGGGAAATGGCGGACTGTTGCGCTAAGCAGGAG CCGGAACGGAACGAGTGTTCCTTCAGCATAAGGATGACAACCCCAACCTCCCTAGAT TGGTCAGACCCGAAGTGGATGTGATGTGCACAGCATTCCATGAGAAAGAGGAACTT TCTCAAAAAGTATTTGTACGAGATTGCCCGACGACACCCCTATTTCTACGCTCCCGAG TTGCTCTTCTTCGCGAAACGGTATAAAGCTGCCTTTACTGAATGCTGTCAAGCAGCGG ACAAGGCCCGCATGCCTCCTTCCCAAAATGGATGAATCCGCGATGAAGGGAAGGCGTC ATCGGCCAAACAGCGGCTTAAGTGCATCGCTTCAGAAATTCGGAGAGAGGGCGTTCC AAAGCGTGGGCGTTCGCGAGACTGTGCGAGAGATTCCCTAAGCGGAATTTGCGAGAGG TATCGAAGCTCGTGACAGACCTCACAAAGGTCCACACCGAATGTTGCCATGGAGACCT GCTTGAGTGCGCCGATGATAGGGCAGACCTCGCAAAGTACATTTGTGAGAATCAGGAC AGCATTAGCTCCAAGCTGAAAGAGTGTGTGAGAAGCCTTGTGTGAAAAATCCCACT GTATCGCCGAGGTAGAAAACGATGAAATGCCCGCTGATCTTCCCTCGCTGGCGCAGAG CTTCGTGAGTGAAGGACGTGTGCAAGAATTACGCGAGGCAAAAGATGTGTTCCTT GGAATGTTCTTTATGAGTATGCGAGAAGGACCCCGGATTATTCGCTGGTACTGCTCT TGCGATTGGCGAAAACGTACGAAACAACGCTTGAGAAGTGTGTGCGGCTGCCGACCC GCATGAGTGTACGCCAAGGTATTTGATGAGTTTAAACCTCTTGTGAGGAACCCAG AATCTTATCAAGCAGAACTGCGAGCTTTTCAAGCAGTTGGGTGAATACAAATTCAGAG ACGCGCTTCTGGTGAGGTATACCAAGAAAGTACCTCAAGTCTCAACACCCACACTCGT CGAGGTGTACGGAACCTCGGGAAAGTAGGGTCAAGTGTGTAAACACCCAGAGGCC AAGCGCATGCCCTGTGCGGAGGACTACCTCTCGGTAGTGTGGAATCAACTGAGTGTGTC TCCACGAAAAGACGCCGCTGTGACACCGCTCACAAAGTGTGACCGGAGAGCCTGGT CAATAGACGCCCCCTGCTTCTCAGCGCTGGAGGTGGATGAGACATACGTCGCGAAAGAG TTTAACGCCGAAACGTTTACTTTTTCATGCTGATATCTGTACGTTGTGAGAGAAGGAAA GGCAAATCAAGAAACAACTGCGCTTGTGGAAGTGGTGAAGCACAACCCGAAGCGAC TAAGGAACAGCTGAAGGCGGTGATGGATGACTTTGCCGCGTTCGTAGAGAAATGCTGT AAAGCAGACGATAAGGAGACTTGTTCGCGAAGAGGGACCTAAACTTGTGTGCTGCAA GTCAAGCTGCCTTAGGCTTATAG
100	V15J15HSA(K573P)AA	MGWSYIILFLVATATGVHSQVLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQ APGGGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDYAVYYCA RSAYDYDGFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVT ITCSASSSVSYMNWYQQKPKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQ PEDFATYYCQQHSSNPPTFGGGTKVZIKGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLVNKKCKC ARITSRRIIPSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCD PTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGGTMVETALTP DACYPDGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHREFKDLGEENFKALVLIAPQYLQCCPFE DHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHFLFGDKLCTVATLRETYGZMADCCAKQE PERNECFLOHKDDNPMLPRLVPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYELARRHPYFYAPE LLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELPRDEGKASSAQRLKCAISLQKFGERA KAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECAADDRADLAKYICENQD SISSKLKECCEKPLLEKSHCLAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFL GMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVDFDKPLVEEPQ NLIRQNCELFQQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEA

SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
		KRMPCAEYDLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTACCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKE FNAETFTTFHADICTLSEKEPQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCTAEZEGPKLVAASQAALGL
101	V15J15HSA(wt) ADN	ATGGGGTGGTCTACATTATCCTGTTCTCGTGGCCACCGCCACTGGCGTGCACTCAC AGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGT GTCCTGCAAGGCCCTCCGGCTACACCTTCATCAGCTACACCATGCAGTGGGTGCGACAG GCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTACATCAACCCTAGATCTGGCTACACCC ACTACAACCAGAAGCTGAAGGACAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTGCCCTCCAC CGCCTACATGGAAGTGTCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC AGATCCGCCTACTACGACTACGACGGCTTCGCCTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGA CAGTGTCTAGCGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTAGTGGCGGTGGCGGATCTGA TATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGCGACAGAGTGACA ATTACCTGCTCCGCCAGCTCCTCCGTGTCTTACATGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCCAAGCGGCTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCTGGCGTGCCCTC CAGATCTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCTGACCATCAGTCCCTGCGAG CCCCGAGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTCCACCTTTG GCGGAGGCCACCAAGTGAAGTCAAAGGCGGCGGAGGAAGCGGGGAGGCGGTTCTGG GGGTGGTGGATCTCAGGAAGATGAGCGGATCGTGTCTGGTGGACAACAAGTCAAGTGC GCCCGGATCACCTCCCGGATCATCCGTCTCCGAGGATCCCAACGAGGACATCGTGG AACGGAACATCAGAATCATCGTGGCCCTGAACAACCGCGAGAACATCTCCGACCCAC CAGCCCTCTGCGGACCGAGATTCGTGTACCACTGTCCGACTGTCAAGAAGTTCGGAC CCTACCGAGGTGGAAGTGGACAACAGATCGTGACCGCCACCCAGTCCAACATCTGCG ACGAGGACTCCGCCACCGAGACATGCTACACCTACGACCGGAACAAGTGTACACCGC CGTGGTGCCCTCTGGTGTACGGCGGCGAGACAAGATGGTGGAAACCGCCCTGACCCCC GACGCTGCTATCCTGATGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGTGGTCTTGGCGGAGGGG GCTCTGACGCCCAAAATCGGAGGTAGCGCACCGGTTCAAAGACTTGGGAGAAGAAAA CTTTAAGGCCCTTGTACTCATTCGCTTTGCGCAGTATTTGCAGCAGTGCCCATTCGAG GACCATGTCAAACCTTGTCAACGAAGTGACAGAGTTTGCAGAACTTGGCTCGCCGACG AATCCGCGGAGAAGTGTGACAAGTGCCTGCATACGTTGTTCCGGGATAAGCTCTGTAC CGTAGCGACCTTGAGGGAACTTACGGGGAAATGGCGGACTGTTGCGCTAAGCAGGAG CCGGAACGGAACGAGTGTTCCTTCAGCATAAGGATGACAACCCCAACCTCCCAGAT TGGTCAGACCCGAAGTGGATGTGATGTGCACAGCATTCATGACAATGAGGAAACCTT TCTCAAAAAGTATTTGTACGAGATTGCCCGACGACACCCCTATTTCTAGCTCCCGAG TTGCTCTTCTTCGCGAAACGGTATAAAGCTGCCTTTACTGAATGCTGTCAAGCAGCGG ACAAGGCCGATGCCTCCTTCCCAAATTTGGATGAAGTCCGCGATGAAGGGAAGGCGTC ATCGGCCAAACAGCGGCTTAAGTGCGCATCGCTTCAGAAATTCGGAGAGAGGGCGTTC AAAGCGTGGGCCGTGCGGAGACTGTGCGAGAGATTCCCTAAGCGGAAATTTGCAGAGG TATCGAAGCTCGTGACAGACCTCACAAAGGTCCACACCGAATGTTGCCATGGAGACCT GCTTGAGTGCGCCGATGATAGGGCAGACCTCGCAAAGTACATTTGTGAGAATCAGGAC AGCATTAGCTCCAAGCTGAAAGAGTGTGTGAGAAGCCTTTGCTGGAAAAATCCCACT GTATCGCCGAGGTAGAAAACGATGAAATGCCCGCTGATCTTCCCTCGCTGGCGGCAGA CTTCGTGAGTGAAGGACGCTGCAAGAATTACGAGAGGCAAAAGATGTGTTCTT GGAATGTTCTTTATGAGTATGCGAGAAGGCACCCGGATTATTCGCTGGTACTGCTCT TGCGATTGGCGAAAACGTACGAAACAACGCTTGAGAAGTGTGTGCGGCTGCCGACCC GCATGAGTGTACGCCAAGGTATTTGATGAGTTAAACCTCTTGTGAGGAACCCAG AATCTTATCAAGCAGAAGTGCAGGCTTTTCAAGCAGTTGGGTGAATACAAATTCAGA ACGCGCTTCTGGTGAGGTATACCAAGAAAGTACCTCAAGTCTCAACACCCACACTCGT CGAGGTGTACGGAACCTCGGGAAGTAGGGTCGAAGTGTGTAAACACCCAGAGGCC AAGCGCATGCCCTGTGCGGAGGACTACCTCTCGGTAGTGTGAATCAACTGTGTGTCC TCCACGAAAAGACGCGGTTGTCAGACCGGTCACAAAGTGTGCACGAGAGAGCCTGGT CAATAGACGCCCCCTGCTTCTCAGCGCTGGAGGTGGATGAGACATACGTCCCGAAAGAG TTTAACGCCGAAACGTTTACTTTTCATGCTGATATCTGTACGTTGTGAGAGAAGGAAA GGCAATCAAGAAACAACTGCGCTTGTGGAAGTGGTGAAGCACAACCGAAGGCGAC TAAGGAACAGCTGAAGGCGGTGATGGATGACTTTGCCGCGTTCGTAGAGAAATGCTGT AAAGCAGACGATAAGGAGACTTGTTTTGGCGAAGAGGGAAGAAACTTGTGCTGCAA

SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
		GTCAAGCTGCCTTAGGCTTATAG
102	V15H5HSA(w) AA	MGWSYIILFLVATATGVH8QVOLVQSGAEVKKPGASVAVSCASGYTFISYTMHWVRQ APGGGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSSLRSEDYAVIYCA PSAYYDYDGFAYWGGGTFLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVT ITCSASSSVSYMNWYQKPKGAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQWSSNPTFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLVDNKCKC ARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCD PTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTP DACYPDGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFRDLGEEFKALVLIAPAOYLQGCFFE DHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCOKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNECFLOHKDDNPNLPRIVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYELAPRHPYFYAPE LLFAKRYKAAFTCCQAADKAACLIPKLDELDEGKASSAKQRLKCA5LQKFERAF KAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECAADDRA5LAKYICENQD SIS5KLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP5LAADFV5SKDVCKNYAEAKDVFL GMFLYFYARRHPDY5VVL5LRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVDFDFKPLVREPO NLIKQNC5ELFKQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRV5ACCTESLVNRRP5CF5ALEVDETYVPKE FNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ5TALVELV5KH5PKATKEQLKAVMD5FAAFVEKCC KADDKETCF5AEEGK5LVAASQAALGL
103	S70 IgM HC ADN	ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCTGAGCCTGGCCTTC GAGCTGAGCTACGGCGAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGCGCCCTCCGGCTTACCTTCTCCGACTCCTG GATCCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGCCTGGATCT CTCCCTACGGCGGCTCTACCTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTC TGCCGACACCTCCAAGAACACCGCTACCTGCAGATGAATCCCTGCGGGCCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGTGCTCGGAGACATTGGCTGGCGGCTTCGACTATTGGGG CCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTGCTGGAAGTGCTAGCGCCCAACCTTTTCCCC CTCGTCTCCTGTGAGAATTCCTCGTGGGATACGAGCAGCGTGCCGTTGGCTGCCTC GCACAGGACTTCCTTCCCGACTCCATCACTTCTCCTGGAATACAAGAACAACTCTG ACATCAGCAGCACCCGGGGCTTCCCATCAGTCTGAGAGGGGGCAAGTACGCAGCC ACCTCACAGGTGCTGCTGCCTTCCAAGGACGTCATGCAGGGCACAGACGAACAGT GGTGTGCAAAGTCCAGCACCCCAACGGCAACAAAGAAAAGAACGTGCCTCTCCAG TGATTGCTGAGCTGCCTCCCAAAGTGAAGCTCTCGTCCACCCCGCAGCGCTTCTT CGGCAACCCCGCAAGTCCAAGCTCATCTGCCAGGCCACGGGTTTCACTCCCGGCA GATTCAGGTGTCTGGCTGCGCGAGGGGAAGCAGGTGGGGTCTGGCGTCAACACG GACCAGGTGCAGGCTGAGGCCAAAGAGTCTGGGCCACGACCTACAAGGTGACCAG CACACTGACCATCAAAGAGAGCGACTGGCTCAGCCAGAGCATGTTACCTGCCGCGT GGATCACAGGGGCTGACCTTCCAGCAGAAATGCGTCTCCATGTGTGTCCTCCGATCA AGACACAGCCATCCGGGTCTTCCGATCCCCCATCTTGGCAGCATCTTCTCACCA AGTCCACCAAGTTGACCTGCCTGGTCACAGACCTGACCACCTATGACAGCGTGACCA TCTCCTGGACCCGCCAGAATGGCGAAGCTGTGAAACCCACACCAACATCTCCGAGA GCCACCCCAATGCCACTTTCAGCGCGGTGGGTGAGGCCAGCATCTGCGAGGATGACT GGAATTCGGGGAGAGGTTACGTGCACCGTGACCCACACAGACCTGCCCTCGCCAC TGAAGCAGACCATCTCCCGGCCAAGGGGGTGGCCCTGCACAGGCCGATGTCTACT TGCTGCCACAGCCCGGAGCAGCTGAACCTGCGGGAGTCGGCCACCATCAGTGC CTGGTGACGGGCTTCTCTCCCGCGGACGCTTCTGTGAGTGGATGCAGAGGGGGCA GCCCTTGTCCCGGAGAGATGTGACAGCGCCCAATGCTGAGCCCCAGGCCCC AGGCCGGTACTTCCGCCACAGCATCCTGACCGTGTCCGAAGAGGAATGGAACACGG GGGAGACCTACACCTGCGTGGTGGCCCATGAGGCCCTGCCAACAGGGTCAACGAG

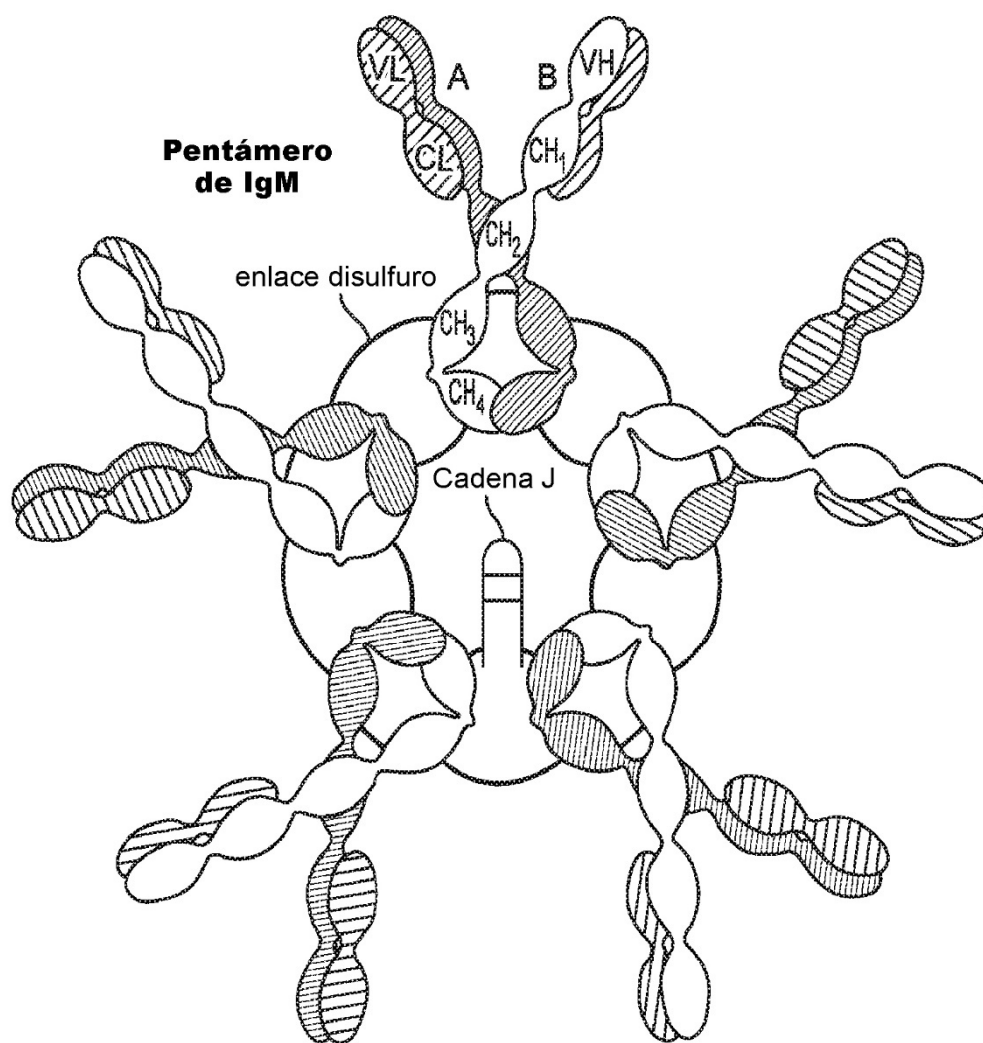
SEQ ID NO:	Nombre abreviado	Secuencia
		AGGACCGTGGACAAGTCCACCGGTAACCCACCGTGTACAACGTGTCCCTGGTCATG TCCGACACAGCTGGCACCTGCTACTAGTAA
104	S70 IgM HC AA	MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAVWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CARRHWPGGFDYWGGQLTVTSAGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLP DSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVCKVQHPH GNKEKNVPLPVI AELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQ VGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRLTFFQGNASS MCPVDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTITYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNIS ESHNPATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVHTDLPSPLKQTSIRPKGVALHRPDVYLLP PAREQLNLRASATITCLVTGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEQPAPGRYF AHSILTVEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
105	S70 IgM LC ADN	ATGGAGACCGACACCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCGGCTCCACC GGAGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTCGGGCCTCTCAGGACGTGTCCACCGCCGTGGCTTGGTATCAG CAGAAGCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTCCGCCTCCTTCTGTACTCCG GCGTGCCCTCCAGATTCTCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTTACCCTGACCATCAG CTCCCTGACGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACCTGTACCACCCC GCCACTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGGACCGTGCCCGCCCGCCCA CGTGTTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGCTGTGGCACC GCCAGCGTGGT GTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACA ACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGA CAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGC ACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAG AGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA
106	S70 IgM LC AA	METDTLLLVWLLLVWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLYHPATFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDTSYLSSTLTLSKADYEHKHYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
107	Y15J AA	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGN KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGGQLTVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVGSYLA WYQQKPG QAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPWTFGQGT KVEIKGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLDNKKCARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIV PLNNRENISDPTSLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYT DRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD
108	V15J AA	MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQ APGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR SAYDYDGFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT TCSASSVSYMNYWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGQEDERIVLDNKKCARIT SRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQI VTATQSNICDEDSATETCYTDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión que comprende un anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA con una cadena J modificada, donde la cadena J modificada comprende una cadena J humana de secuencia nativa de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 modificada mediante la introducción de un resto de unión, donde el resto de unión es un resto de unión extraño que antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T, donde el resto de unión se selecciona de entre el grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos que se unen al antígeno y conjugados anticuerpo-fármaco, donde el resto de unión se introduce en el polipéptido de la cadena J de secuencia nativa mediante (i) fusión directa o indirecta en el extremo C-terminal o cerca del mismo y/o el extremo N-terminal de la secuencia de la cadena J, donde la fusión indirecta es a través de un enlazador peptídico o (ii) derivatización química o quimioenzimática, y donde el resto de unión de la cadena J modificada se une a una proteína de la superficie celular seleccionada de entre el grupo que consiste en: CTLA4, PD-1, TIM3, LAG3, BTLA, VISTA y TIGIT.
2. La molécula de unión según la reivindicación 1, donde el anticuerpo de IgM, IgA, IgG/IgM o IgG/IgA
 - (a) antagoniza una vía de señalización inhibidora de células T, donde el anticuerpo se une a una diana seleccionada de entre el grupo que consiste en: PD-1, PD-L1, TIM3 y LAG3;
 - (b) agoniza una vía de señalización estimuladora de células T, donde el anticuerpo se une a una diana seleccionada de entre el grupo que consiste en: CD137, OX40, CD40, GITR, CD27 y HVEM;
 - (c) se une a una diana de expresión de bajo nivel, donde la diana de expresión de bajo nivel se selecciona de entre el grupo que consiste en: EGFR, HER2, HER3, EpCAM, CEACAM, Gp100, MAGE1 y PD-L1, o donde la diana de expresión de bajo nivel es una proteína de la superficie celular en una célula cancerosa epitelial;
 - (d) se une a una diana de baja afinidad, donde la diana de baja afinidad se selecciona de entre el grupo que consiste en: NY-ESO-1, antígeno Sialyl Lewis X y antígeno Tn, o donde la diana de baja afinidad es una proteína de la superficie celular en una célula de cáncer epitelial; o
 - (e) se une a una proteína de la superficie celular en una célula cancerosa hematológica seleccionada de entre el grupo que consiste en: CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52 y CD70.
3. La molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el resto de unión se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 mediante fusión directa o indirecta, donde la fusión indirecta se realiza a través de un enlazador peptídico, donde el resto de unión se introduce en o dentro de 10 residuos del extremo C- y/o N-terminal de SEQ ID NO: 1.
4. La molécula de unión según la reivindicación 3, donde el resto de unión se introduce en la secuencia de la cadena J humana nativa de SEQ ID NO: 1 mediante derivatización química o quimioenzimática por un enlazador químico escindible o no escindible, donde el enlazador escindible es un enlazador químicamente lábil o un enlazador enzimáticamente lábil, y donde 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-succinimidil-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.
5. La molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la secuencia de la cadena J humana modificada comprende la secuencia de la cadena J humana nativa de la SEQ ID NO: 1.
6. La molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el resto de unión es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste en: F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv, y anticuerpo de dominio único.
7. Una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer, donde la composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de la molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. La molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso como un medicamento en el tratamiento del cáncer.
9. La molécula de unión para el uso de la reivindicación 8, donde el cáncer es un cáncer hematológico o un cáncer epitelial.
10. La molécula de unión para el uso de la reivindicación 9, donde el cáncer hematológico es una leucemia, linfoma, mieloma o síndrome mielodisplásico; y

- (a) donde la leucemia es opcionalmente una leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena crónica o leucemia linfocítica crónica; o
- (b) el linfoma es linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin.

- 5 11. La molécula de unión para el uso de la reivindicación 9, donde el cáncer epitelial es un melanoma, cáncer de células no pequeñas, nasofaríngeo, colorrectal, de hígado, de vejiga urinaria, de ovario, gástrico, de esófago, de páncreas, de riñón, de tiroides o de mama, donde el cáncer de mama es opcionalmente cáncer de mama con receptores hormonales negativos o triple negativo.
- 10 12. La molécula de unión para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde el medicamento comprende además una cantidad efectiva de un segundo agente terapéutico.



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

FIG. 1

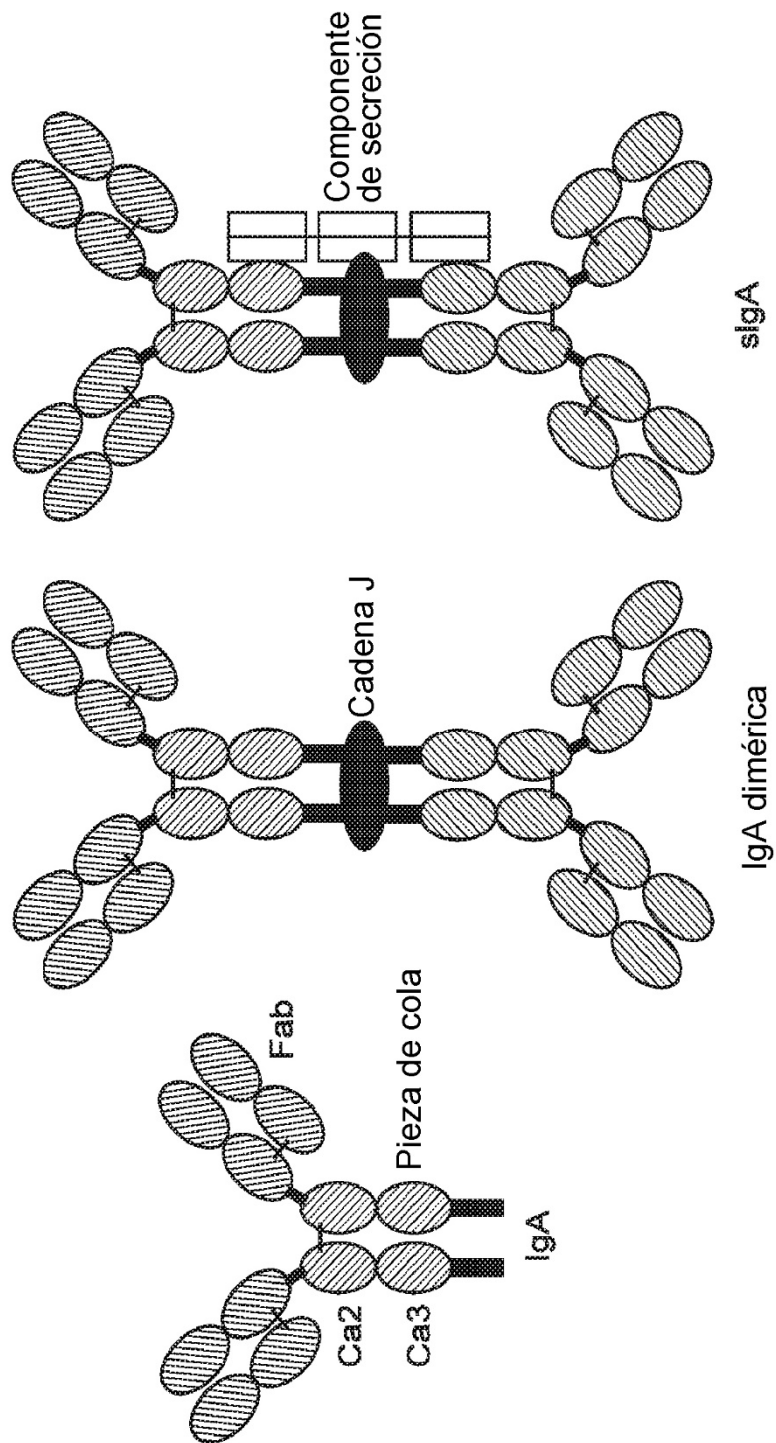


FIG. 2

Cadena J humana madura

- QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSDPNEDIVERNI
RIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPT
EVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYT
AVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPD (SEQ ID NO:
1)
- Número de aminoácidos: 137
- Peso molecular: 15594,4
- pl teórico: 4,59

FIG. 3

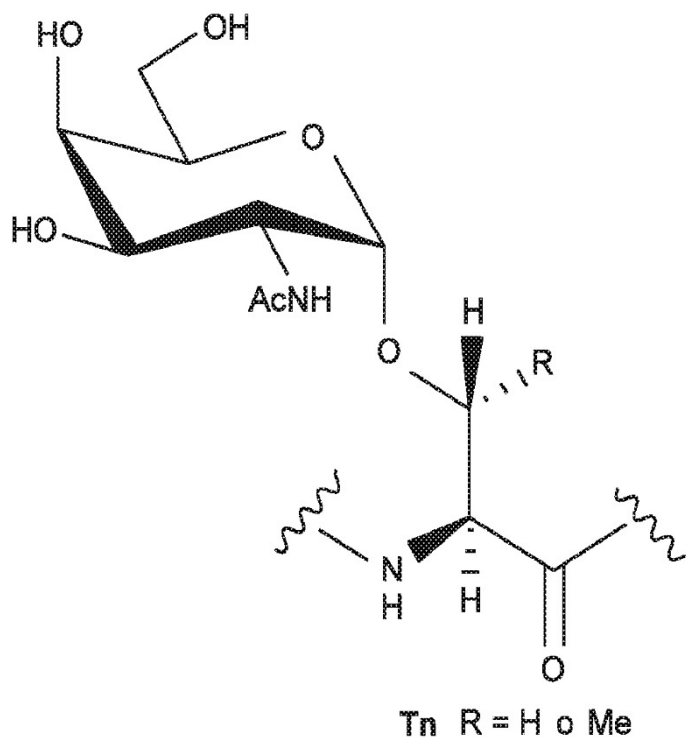


FIG. 4

Orientación de las construcciones de cadena J

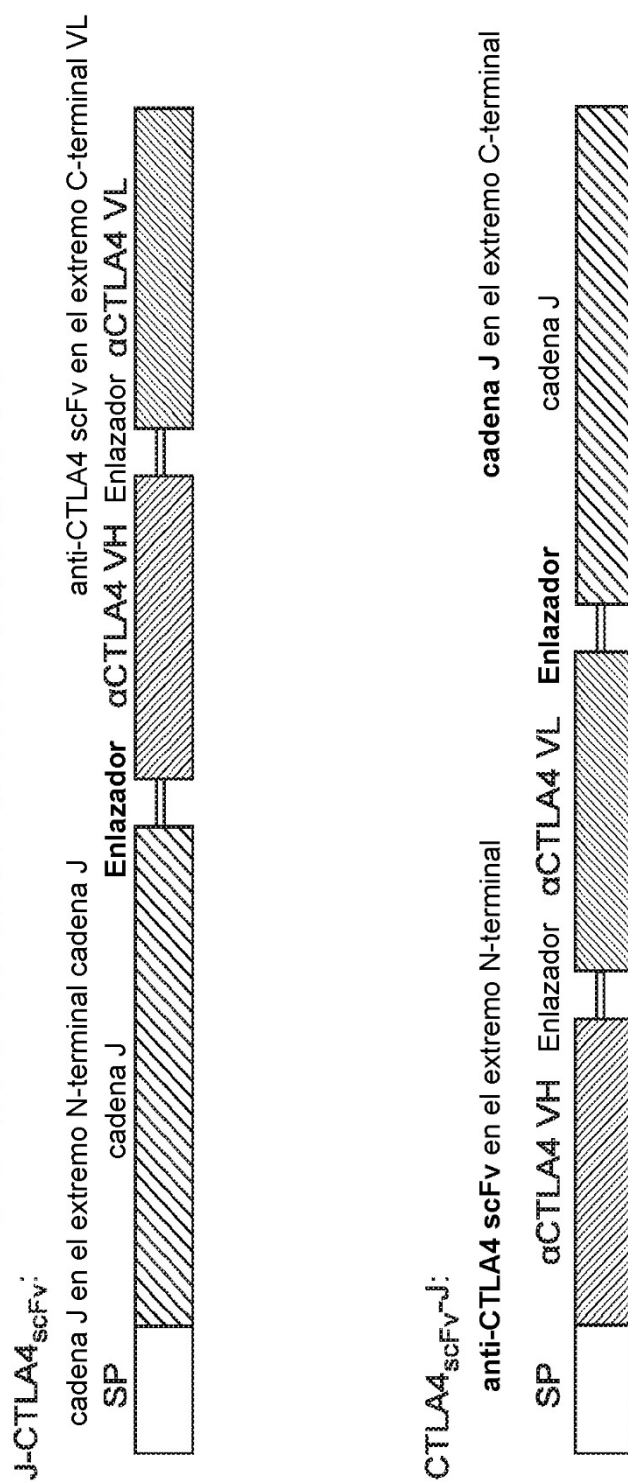


FIG. 5

Pentámero de IgM asimétrica con cadena J modificada

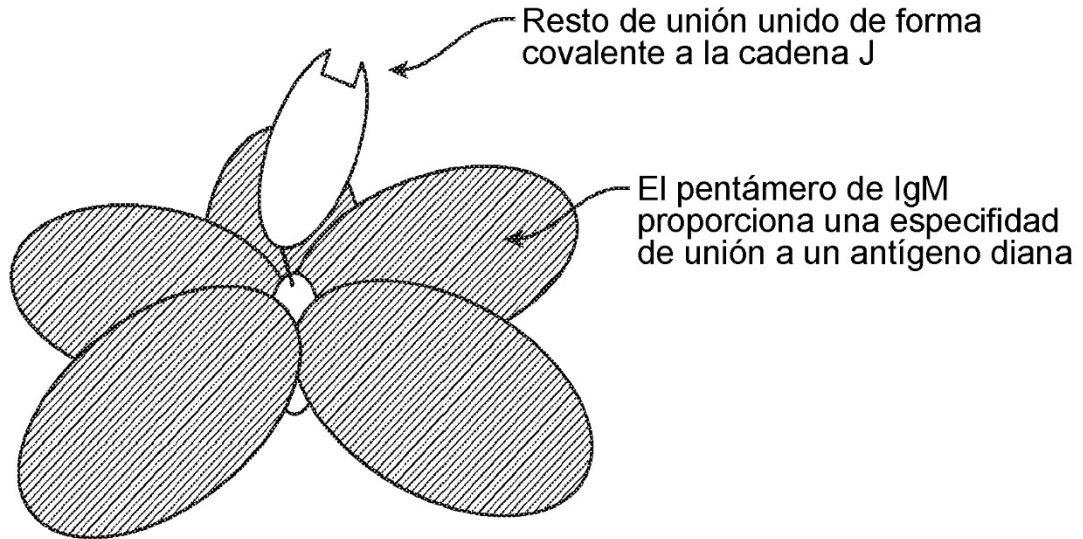


FIG. 6

**Estrategia controlada por menú respecto a moléculas de unión:
Diana de resto de unión a cadena J de la diana de anticuerpo X**

Diana de anticuerpo	Diana de resto de unión a cadena J
Dianas superagonistas: CD137 (4-1BB), OX40, CD40, GITR, CD27, HVEM	Antagonista de las vías de señalización inhibidora de células T: CTLA4 PD-1 TIM3 LAG3 BTLA VISTA TIGIT CD3
Dianas de expresión de bajo nivel: EGFR, HER2, HER3, EpCAM, CEACAM, Gp100, MAGE1, PD-L1	
Diana de baja afinidad: NY-ESO-1, antígeno Sialyl Lewis X, antígeno Tn	
Dianas de cáncer hematológico: CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52, CD70	

FIG. 7

**Análisis por gel SDS PAGE híbrido e
inmunoelectrotransferencia de IgM
bispecífica anti-PDL1 X anti-CTLA-4**

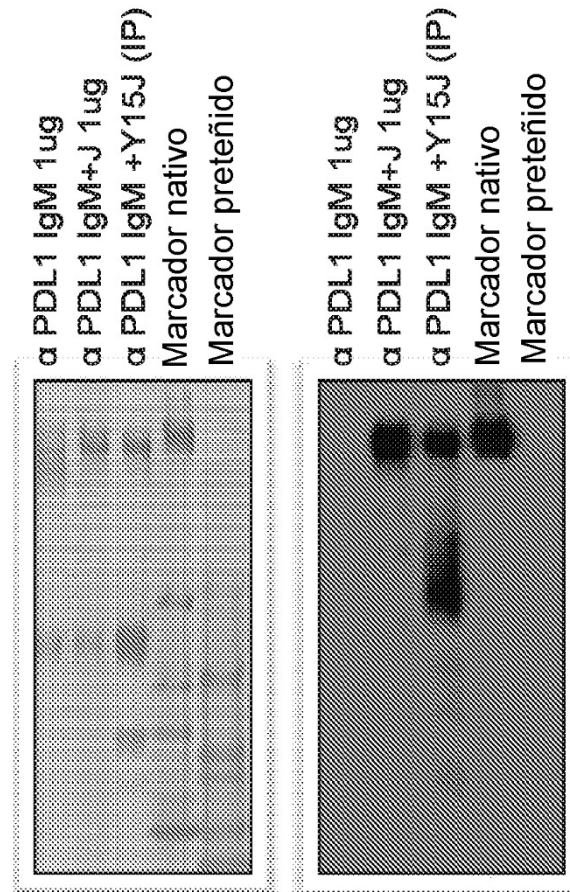


FIG. 8

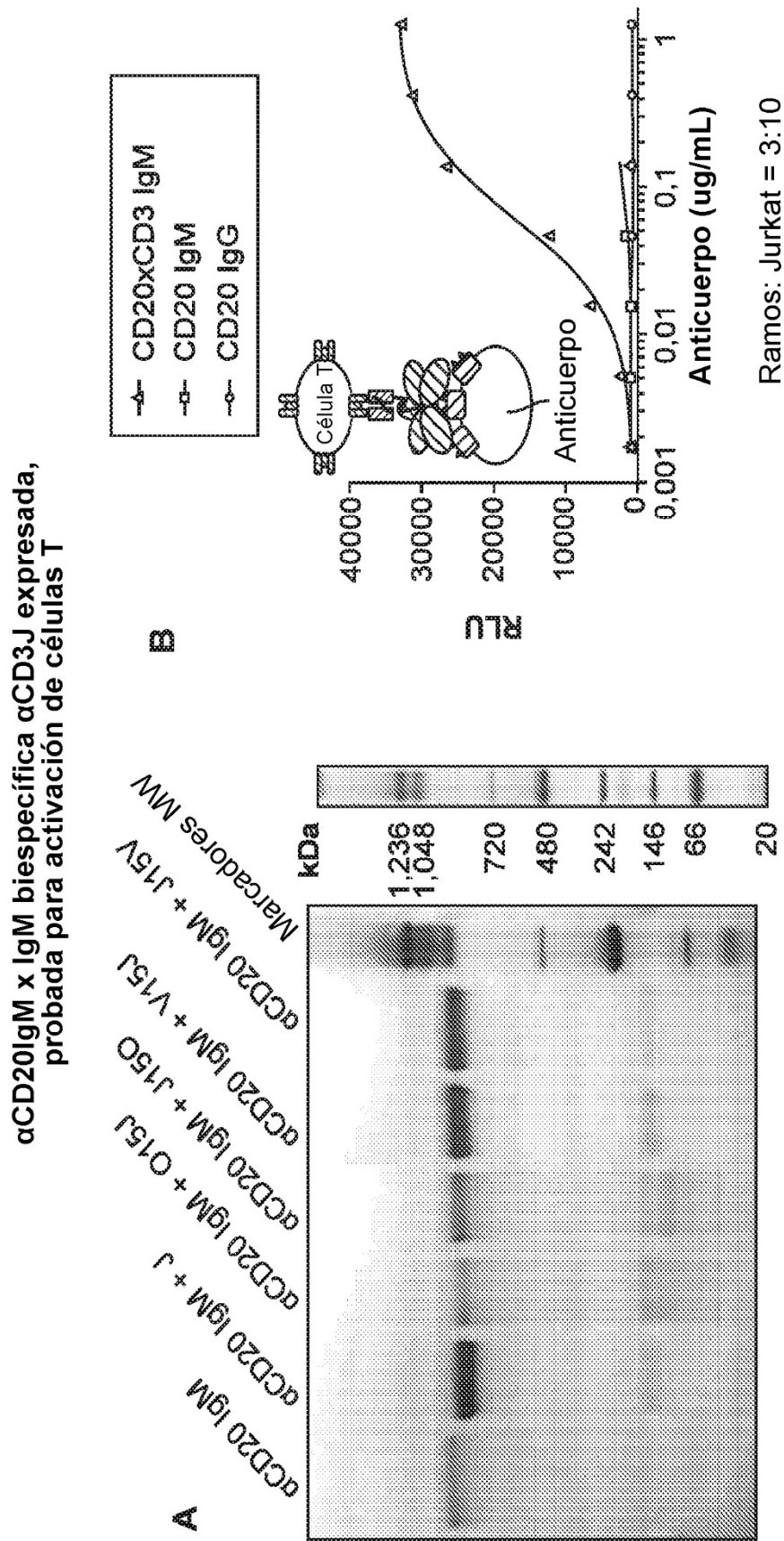


FIG. 9

Las IgM anti-PDIL-1 muestran una mejor unión para reducir las dianas en abundancia en comparación con IgG

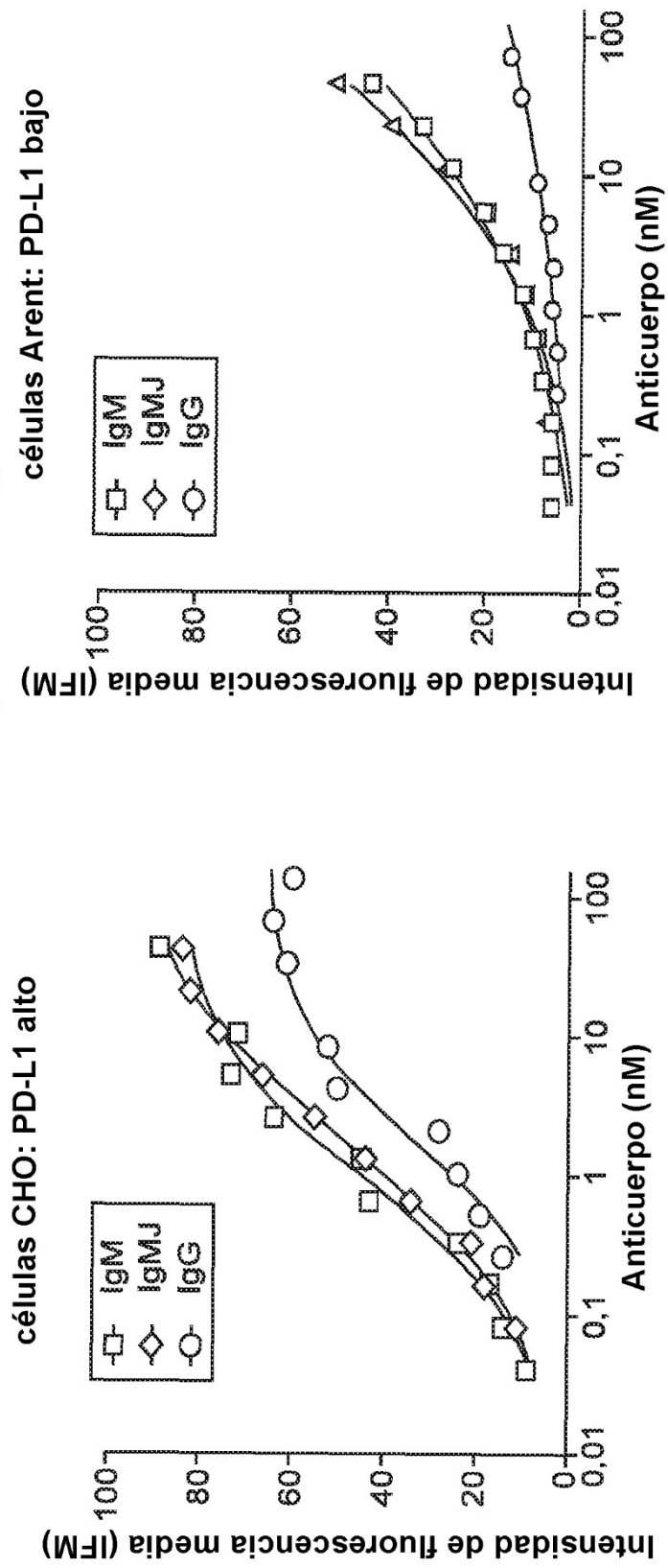


FIG. 10

Las IgM muestran una inhibición más potente de la interacción PD-1:PD-L1 que IgG

**6x más potente en la base molar
100 eficacia molar en células T**

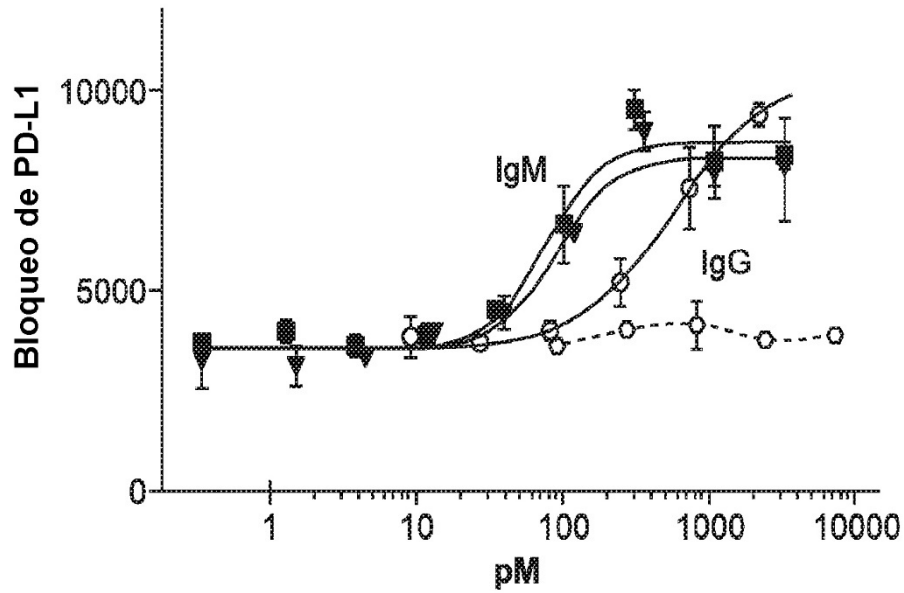


FIG. 11

PD-L1XCD3 biespecífico se puede realizar y es funcional para un bloqueo de PD-L1

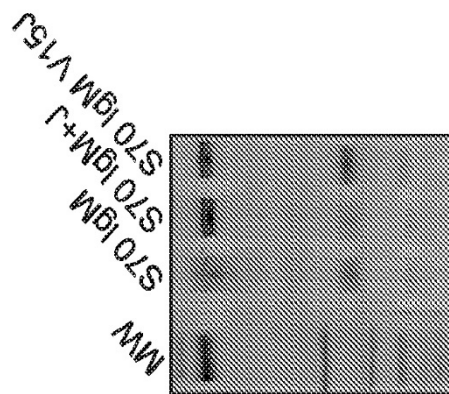


FIG. 12A

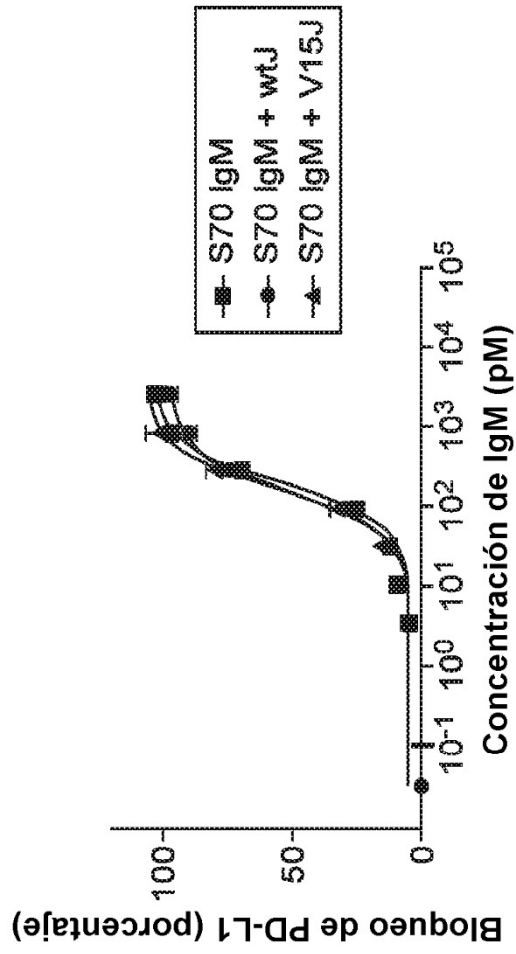


FIG. 12B

Activación de células T por PD-L1XCD3 biespecífico en presencia de células que expresan PD-L1

Dependiente de HDLM2
Activación de células T 20160804

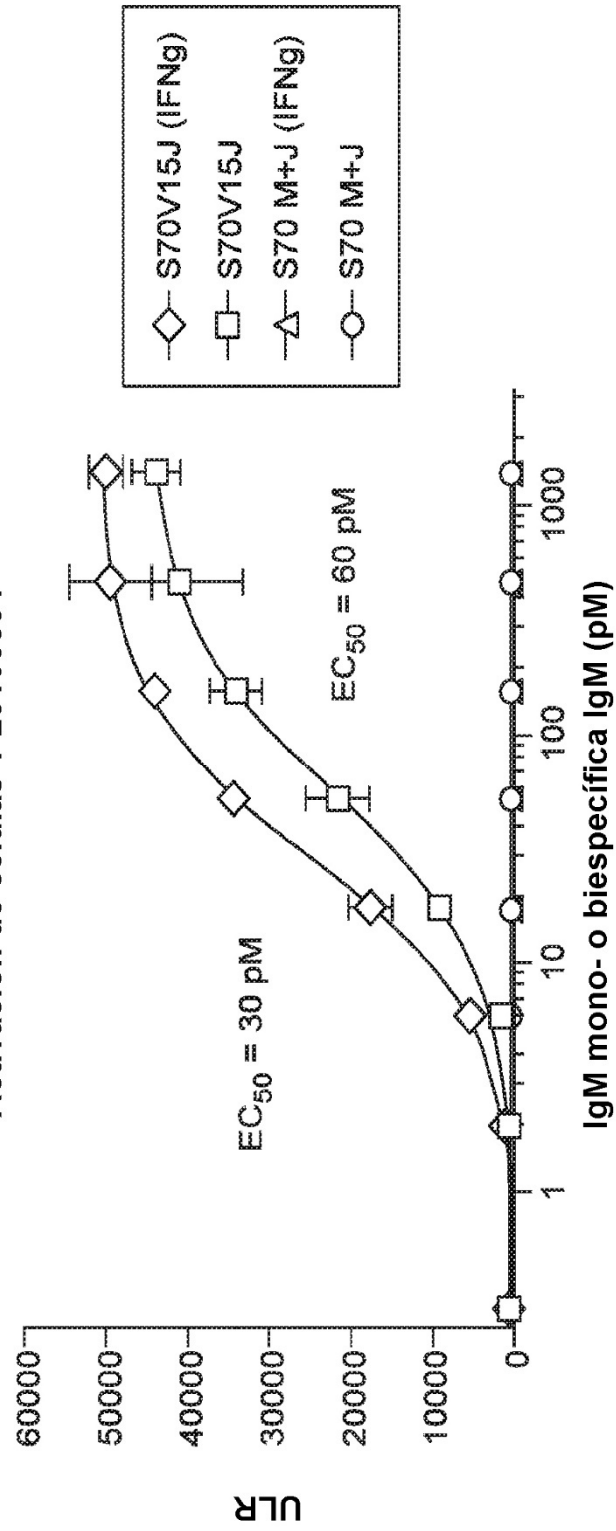


FIG. 13

**Destrucción de células dependiente de células T por PD-L1XCD3
biespecífico en presencia de células que expresan PD-L1**

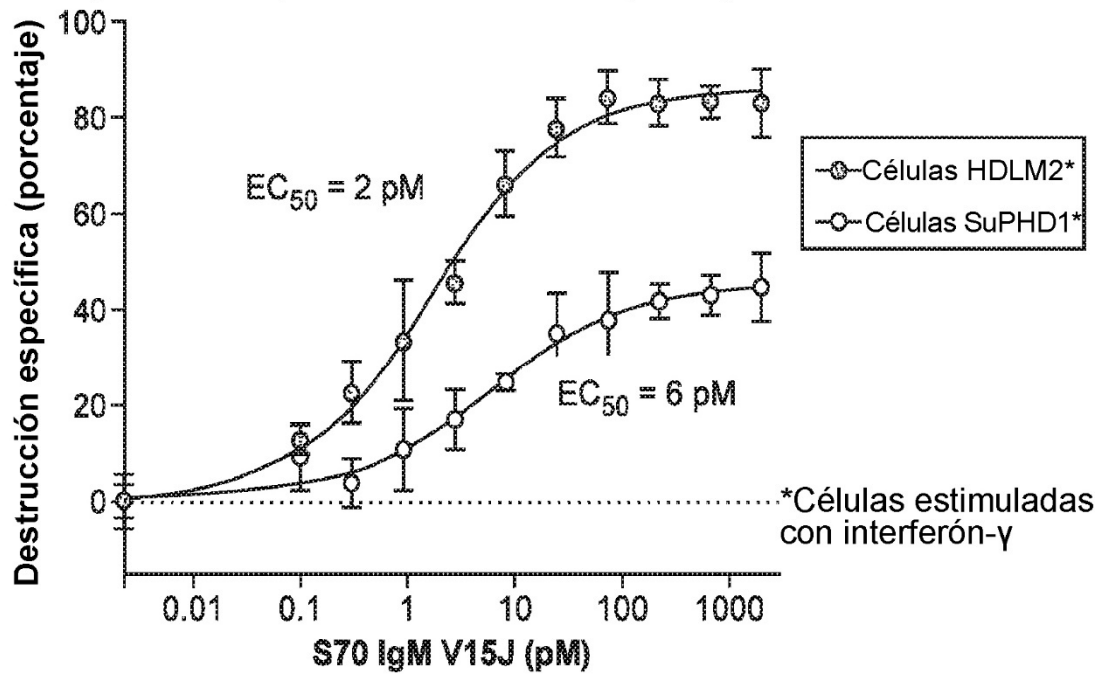


FIG. 14

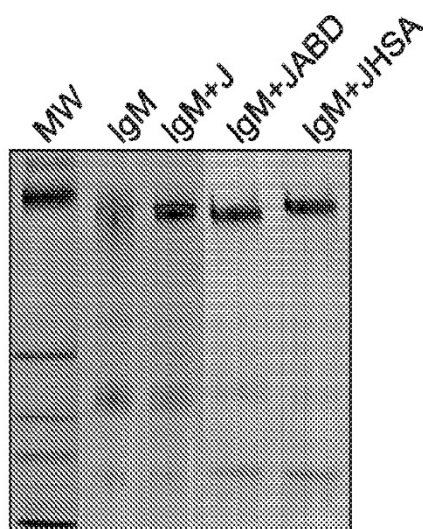


FIG. 15A

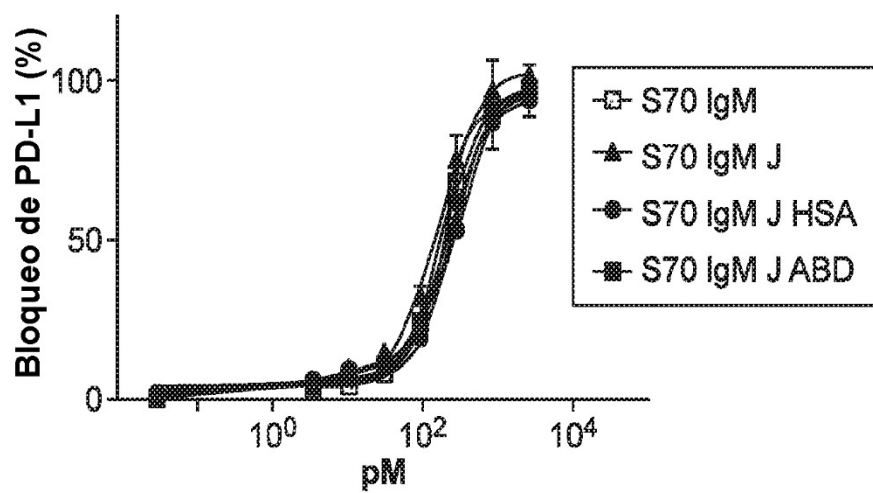


FIG. 15B

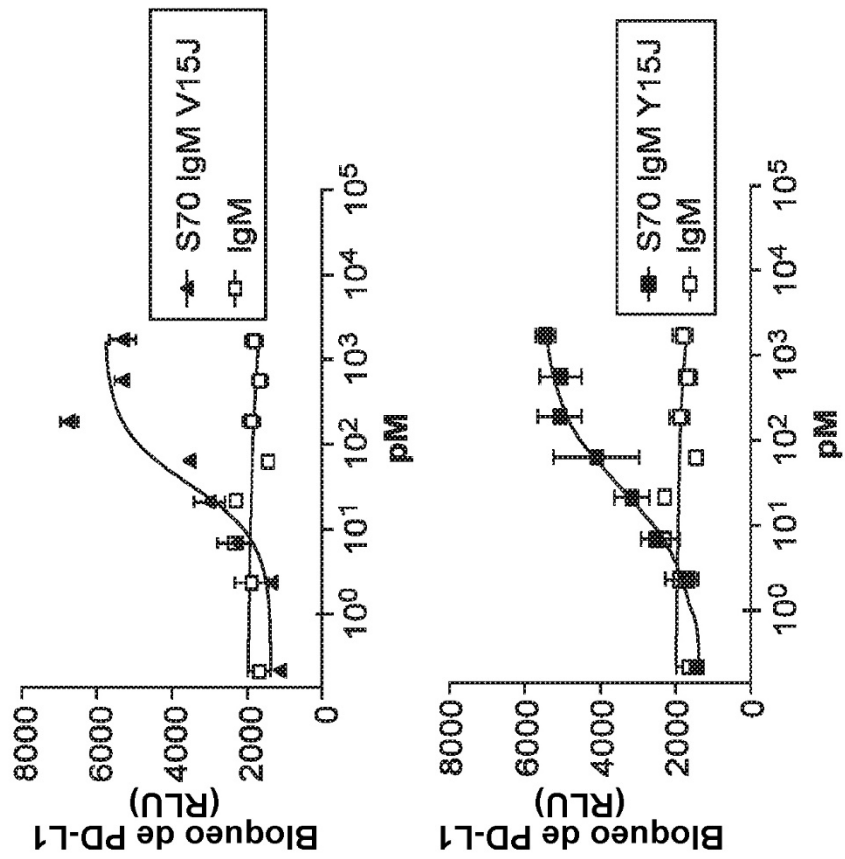


FIG. 16B

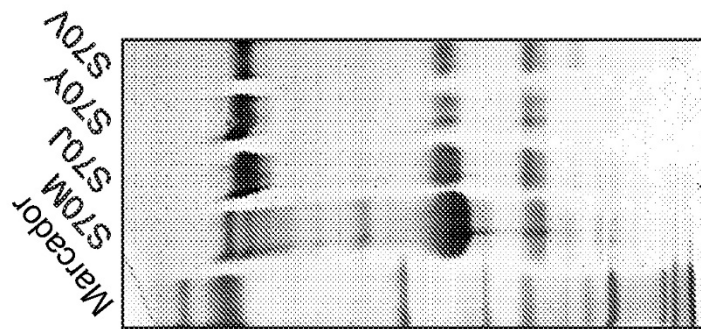


FIG. 16A

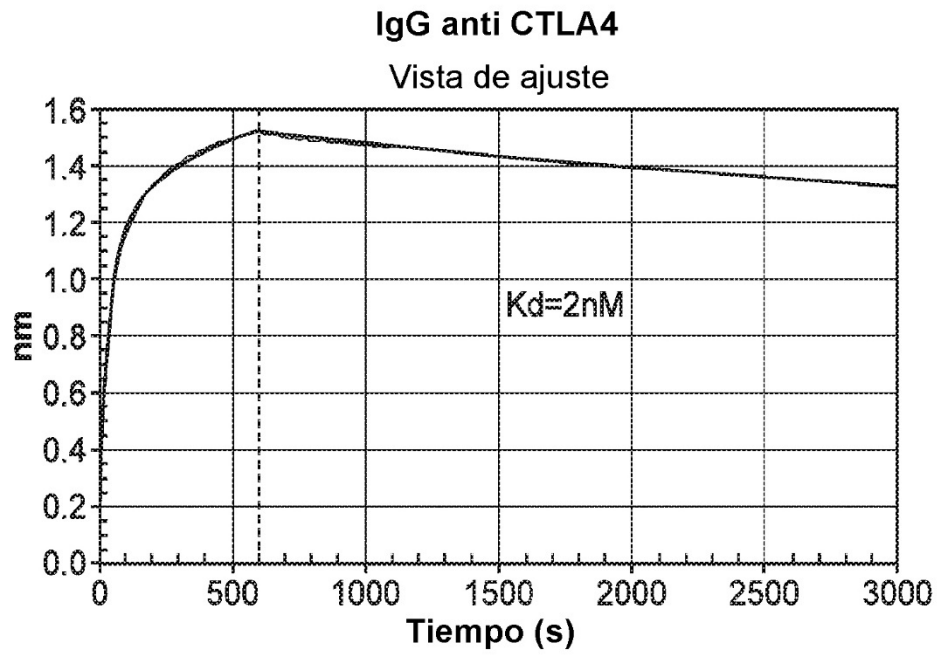


FIG. 17A

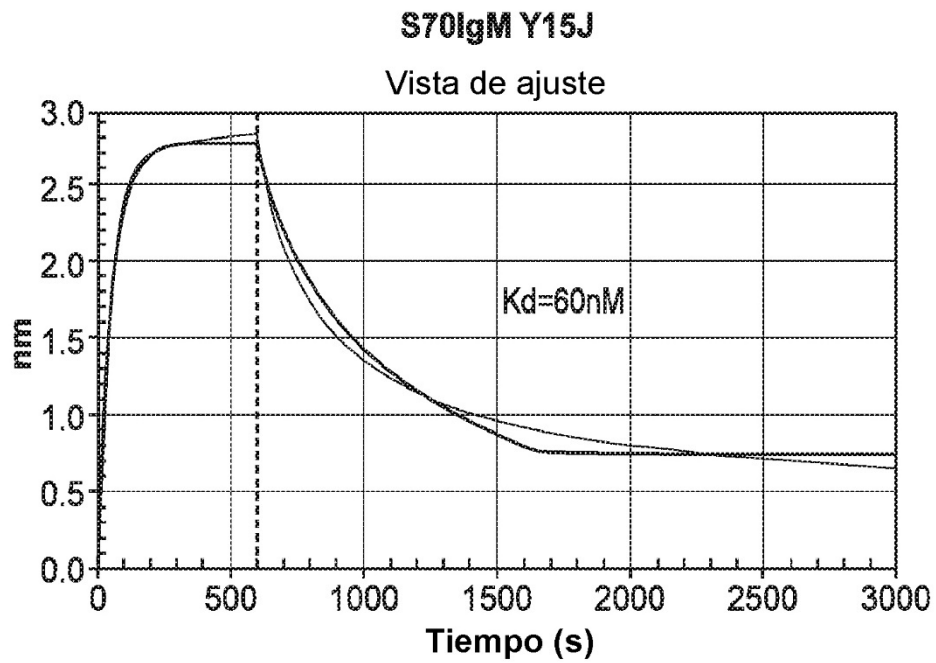


FIG. 17B

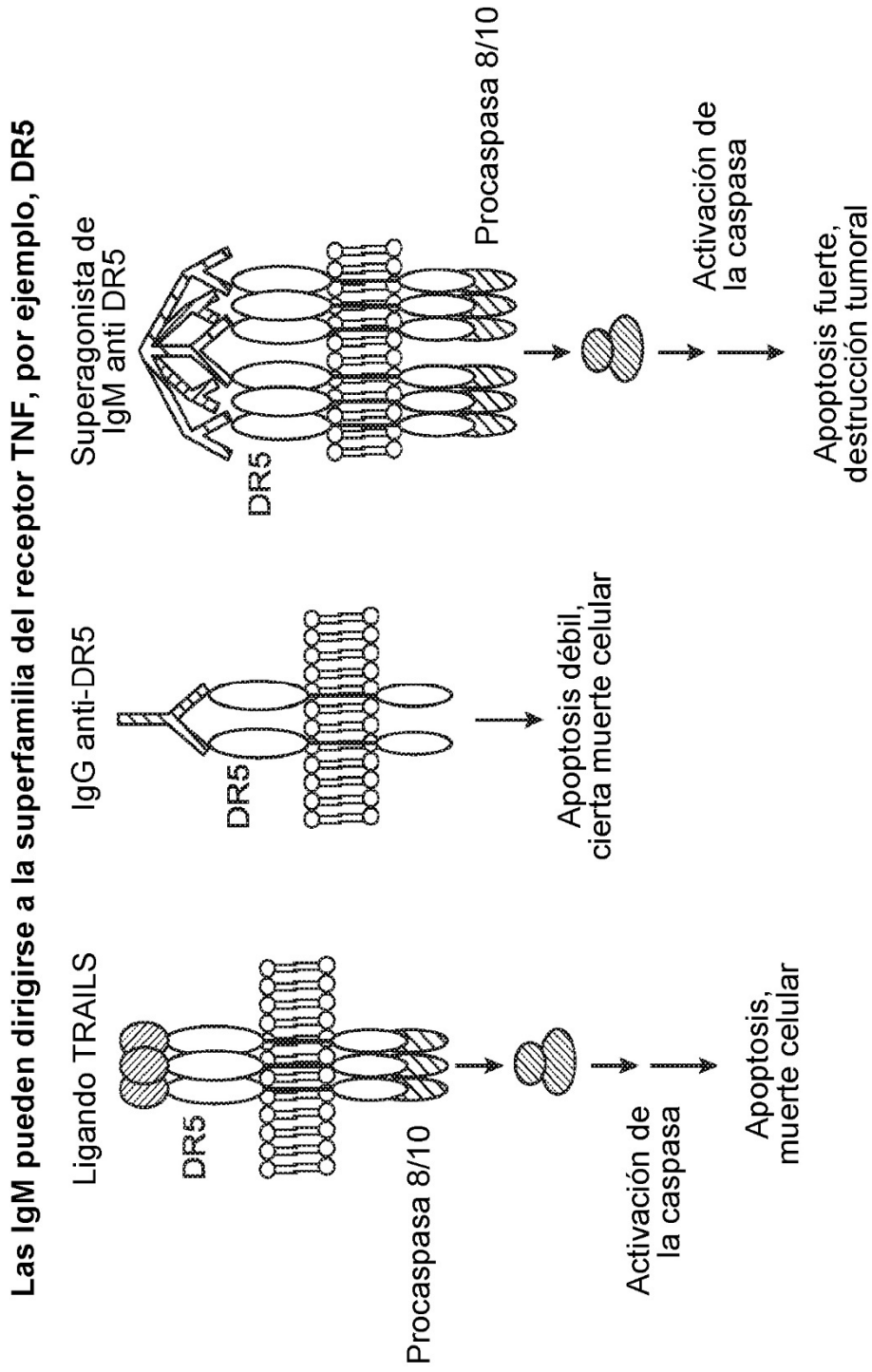


FIG. 18

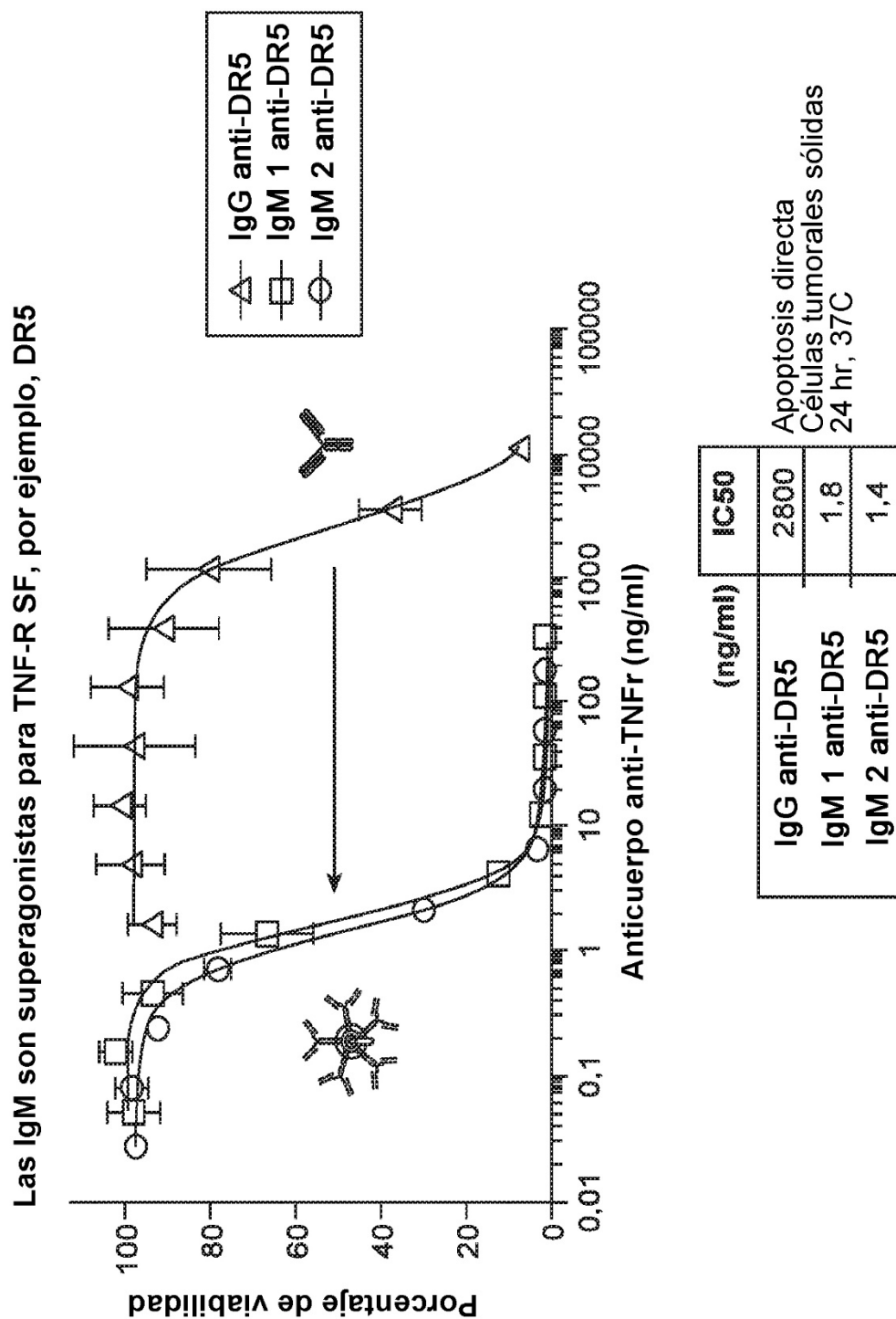


FIG. 19