

MOLÉCULAS DE UNIÓN PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con moléculas de unión novedosas. La invención se relaciona de manera específica con moléculas de unión novedosas que se unen al receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2) y con cadherina-3 (CDH3). La invención también se relaciona con ácidos nucleicos que codifican para dichas moléculas de unión; con métodos para preparar dichas moléculas de unión; con células huésped que expresan o que tienen la capacidad de expresar dichas moléculas de unión; con composiciones que comprenden dichas moléculas de unión; y con usos de dichas moléculas de unión o dichas composiciones, en particular con propósitos terapéuticos en el campo de las enfermedades cancerosas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer es una enfermedad caracterizada por crecimiento celular anormal localizado, con potencial de esparcirse a través del cuerpo. Es una enfermedad grave y la segunda causa de muerte más habitual en el mundo desarrollado.

En el pasado, los medios más frecuentes para tratar los cánceres tumorales han sido a través de la cirugía, tratamiento con radiación, y el uso de fármacos quimioterapéuticos o inmunoterapia. A pesar de que en los últimos años ha habido avances en el tratamiento de ciertos cánceres, aún existe una necesidad de mejorar el tratamiento de esta enfermedad.

Las moléculas biológicas basadas en anticuerpos ofrecen el potencial de ser agentes terapéuticos poderosos para el tratamiento del cáncer. Los anticuerpos se diseñan para reconocer y unirse a la superficie de las células

(sus antígenos diana), y dichas proteínas pueden estar presentes solo en la superficie de células cancerosas específicas o en células del sistema inmunológico. Esta unión puede provocar un número de diferentes respuestas biológicas, dependiendo de la función de su proteína antígeno diana y también de la estructura del anticuerpo mismo y su sitio de unión. Por ejemplo, algunos anticuerpos gatillan al sistema inmunológico para atacar y matar a las células cancerosas, atrayendo las células del sistema inmunológico a las células cancerosas o influyendo directamente sobre la actividad del sistema inmunológico mismo. Otros tipos de anticuerpos tienen fármacos o partículas radiactivas unidas a los mismos y por lo tanto proveen estos fármacos terapéuticos a la célula cancerosa. Otro tipo de anticuerpos que se unen a células cancerosas activan o inhiben mecanismos específicos que pueden reducir la división celular o incluso matar a las células tumorales.

La apoptosis (o muerte celular programada) es un mecanismo celular controlado, en el cual el organismo mantiene la homeostasis celular en compartimientos de tejido normal y elimina las células alteradas.

Existen dos vías principales de señalización que conducen a la apoptosis en las células de los mamíferos: la vía intrínseca y la vía extrínseca. La vía intrínseca se inicia a nivel mitocondrial y cumple un rol importante en la muerte celular inducida por quimioterapia o radiación. Por el contrario, la vía extrínseca de muerte se inicia a través de señales mediadas por receptores de muerte en la superficie celular.

La muerte celular inducida a través de la vía extrínseca ha sido estudiada de manera extensa siguiendo las señales mediadas por diferentes miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). La

superfamilia de TNF se caracteriza por una secuencia de dos a cinco repeticiones extracelulares ricas en cisteína. Los receptores de muerte que pertenecen a la superfamilia de TNF comparten un dominio de muerte intracelular homólogo de aproximadamente 80 aminoácidos, que es esencial para la transducción de las señales apoptóticas. El ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) es un ligando proteico natural que interacciona con dos tipos de receptores: receptores de muerte que inician y receptores señuelo que inhiben la apoptosis inducida por TRAIL. Hasta la actualidad, se han identificado cuatro receptores humanos específicos de TRAIL: los receptores de muerte, DR4 (DR4/TRAIL receptor 1/TRAILR1) y DR5 (TRAIL receptor 2/TRAIL-R2/KILLER), y los receptores señuelo, DcR1/ TRAILR3/TRID y DcR2/TRAILR4. TRAIL también se puede unir a osteoprotegerina (OPG), un receptor señuelo soluble, con baja afinidad.

El direccionamiento a los receptores TRAIL ha sido considerado un abordaje útil en el desarrollo de terapias contra el cáncer, ya que si una molécula basada en un anticuerpo se puede unir y activar al receptor TRAIL, es decir una molécula agonista del receptor TRAIL, entonces puede inducir la apoptosis en las células cancerosas. Tal como se muestra en muchos estudios preclínicos, la señalización por TRAIL induce de manera eficaz la apoptosis en varias líneas celulares tumorales pero no en la mayoría de las células normales. Sin embargo, también se ha informado que tejidos normales, especialmente los hepatocitos en el hígado, son susceptibles a este mecanismo de inducción de apoptosis. Por lo tanto, si se usa una molécula que activa de manera muy eficaz a la vía, se pueden inducir efectos secundarios severos debido a la inducción de apoptosis en las células no cancerosas. Por otra parte, se ha mostrado que las moléculas

de activación débil tienen una actividad anticancerosa débil, a pesar de que son bien toleradas.

Un abordaje es combinar el direccionamiento al receptor TRAIL con un marcador específico de células cancerosas, es decir una proteína que no se expresa o que se expresa poco en las células cancerosas.

Se han propuesto varias dianas de anclaje diferentes como pares de combinación adecuados para las moléculas de unión al receptor TRAIL.

También se ha propuesto a la FAP (proteína de activación de Fibroblastos) como una diana de anclaje. Sin embargo, la FAP solo se expresa en fibroblastos activados que están localizados en el estroma del tumor. La FAP no se expresa en células cancerosas epiteliales. Por lo tanto una molécula biespecífica contra FAP solo funcionará para promover la apoptosis en aquellas células cancerosas que están en contacto físico cercano con un fibroblasto activado (Brünker y col., *Molecular Cancer Therapeutics* (2016), 15(5):946-957). Las células tumorales que no están en contacto directo con un fibroblasto activado no serán afectadas por este tratamiento y continuarán proliferando. Por lo tanto existen desventajas claras con el uso de FAP como una diana de anclaje para mediar la apoptosis inducida por el receptor TRAIL en células cancerosas. Además, debido a que los fibroblastos activados también se encuentran en sitios de remodelamiento de tejido que incluye fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, arteriosclerosis y artritis, una molécula biespecífica dirigida contra FAP y el receptor TRAIL potencialmente podría anclarse en la superficie de los fibroblastos activados e inducir la apoptosis en células sensibles a TRAIL normales vecinas en el hígado u otros órganos.

De manera similar, se ha propuesto a MCSP (proteoglicano condroitin sulfato asociado a melanoma) y ROBO4 (roundabout homólogo 4) como dianas de anclaje (He Yuan y col., *The Journal of Investigative Dermatology* (2016), 136(2):541-544; WO2011039126A1). Además de su expresión en la superficie celular de melanomas, el MCSP se expresa principalmente en neovasculatura. El ROBO4 se expresa de manera específica en células endoteliales. Ambos se describen en sitios de angiogénesis en diferentes tipos tumorales. Por lo tanto, como para FAP, y solo con la excepción de los melanomas que expresan MSCP, para ser eficaz, una molécula biespecífica dirigida contra MCSP o ROBO4 y un receptor TRAIL solo funcionará para promover la apoptosis en células cancerosas si se encuentran en contacto físico cercano con las células endoteliales. Esto no siempre será posible ya que un tumor crece rápidamente a medida que crece el suministro de sangre. Por lo tanto, nuevamente, existen desventajas con el uso de estas moléculas como dianas de anclaje.

De manera adicional, se ha informado que un anticuerpo biespecífico dirigido anti-TRAILR2 y LT β R (Receptor de linfotoxina-beta) resulta activo para inhibir el crecimiento tumoral en modelos murinos de xenoinjerto de tumor a niveles comparables o mayores que la combinación de los respectivos anticuerpos parentales (Michaelson y col., *mAbs* (2009), 1(2):128-141). Se ha mostrado que la señalización de LT β R en ratones es crítica para la regeneración del hígado, en donde LT β R se expresa en los hepatocitos maduros (Anders R.A. y col. *J Immunol* (2005), 175(2):1295-1300). De manera similar a FAP, la señalización de LT β R se encuentra muy activada durante la inflamación hepática crónica en pacientes con hepatitis viral y no viral, colangitis y HCC. En particular, se ha descrito su expresión en hepatocitos (Haybaeck J. y col. *Cancer Cell*

(2009), 16(4): 295-308). El direccionamiento a LT β R y al receptor TRAIL potencialmente podría permitir el anclaje sobre la superficie de los hepatocitos que expresan LT β R que son sensibles a la activación de TRAILR2, y por lo tanto potencialmente podría provocar toxicidad hepática.

Finalmente, también se ha sugerido que TENASCIN C es una diana de anclaje útil. La TENASCIN C es una proteína secretada y por lo tanto no se encuentra anclada a la membrana celular. Esto representa otro ejemplo de un mecanismo indirecto para inducir apoptosis en células cancerosas. Al igual que para los abordajes de anclaje a MCSP o ROBO4, la unidad TENASCIN C debe encontrarse en una orientación apropiada respecto a las moléculas TRAILR2 en la membrana de la célula cancerosa para que se induzca la apoptosis. Además, la expresión de TENASCIN C también se encuentra aumentada en la enfermedad hepática crónica y se espera que el tratamiento con la molécula biespecífica que comprende un agonista de TRAIL empeore la condición.

Por lo tanto, a pesar de que se ha avanzado en el tratamiento de ciertos cánceres en los últimos años y a pesar del hecho de que actualmente se están buscando diferentes abordajes, aún existe una necesidad de proveer compuestos adecuados terapéuticamente y novedosos para el tratamiento del cáncer y en particular de desarrollar moléculas biológicas basadas en anticuerpos terapéuticamente eficaces pero seguras que pueden funcionar como moléculas agonistas del receptor TRAIL.

Por lo tanto es un objetivo de la presente invención el generar moléculas agonistas del receptor TRAIL que tengan un perfil terapéutico mejorado y que provean ciertas ventajas en comparación con los agentes, composiciones y/o métodos usados en la actualidad y/o que se conocen en el arte. Estas ventajas

incluyen eficacia *in vivo*, propiedades terapéuticas y farmacológicas mejoradas, menos efectos secundarios, y/u otras propiedades ventajosas tales como alta estabilidad, particularmente en un ambiente de pH bajo, y facilidad mejorada de elaboración o costo reducido de materiales, especialmente en comparación con las moléculas ya conocidas en el arte.

SÍNTESIS BREVE DE LA INVENCIÓN

El objetivo es resuelto mediante el objeto de la presente invención. La presente invención se basa en el concepto de la combinación de un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica al receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2) con un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a cadherina-3 (CDH3) en una molécula de unión individual. Tal como se describe con mayor detalle más adelante, una ventaja de la molécula de la invención es que la apoptosis es solo promovida en células que presentan a ambos, TRAILR2 y CDH3 en su superficie.

Los inventores de la presente invención han descubierto además que el uso de un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica al dominio extracelular 1 (EC1) de CDH3 mejora significativamente la eficacia de la molécula de unión.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, la invención provee una molécula de unión que comprende:

- (a) por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica al receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2), y
- (b) por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a cadherina-3 (CDH3), en donde dicho por lo menos un sitio de unión

al antígeno que se une de manera específica a CDH3 se selecciona del grupo que consiste en:

i. un sitio de unión al antígeno que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:3 (CDR1), SEQ ID NO:4 (CDR2) y SEQ ID NO:5 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3);

ii. un sitio de unión al antígeno que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:17 (CDR1), SEQ ID NO:18 (CDR2) y SEQ ID NO:19 (CDR3);

iii. un sitio de unión al antígeno que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:23 (CDR1), SEQ ID NO:24 (CDR2) y SEQ ID NO:25 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:27 (CDR1), SEQ ID NO:28 (CDR2) y SEQ ID NO:29 (CDR3); y

iv. un sitio de unión al antígeno que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:33 (CDR1), SEQ ID NO:34 (CDR2) y SEQ ID NO:35 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) y SEQ ID NO:39 (CDR3).

En un aspecto específico, la invención provee una molécula de unión que tiene por lo menos un sitio de unión al antígeno (un primer sitio de unión al antígeno) que se une de manera específica al receptor de ligando inductor de

apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2) y por lo menos un sitio de unión al antígeno (un segundo sitio de unión al antígeno) que se une de manera específica al dominio extracelular 1 (dominio EC1) de cadherina-3 (CDH3).

De manera específica, la molécula de unión provista en la presente es una molécula de unión biespecífica.

En un aspecto, la molécula de unión provista en la presente reconoce además a un antígeno que comprende la SEQ ID NO:98, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:98.

En un aspecto específico, la molécula de unión provista en la presente de manera específica se une a un antígeno que comprende la SEQ ID NO:99, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:99.

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la invención, el sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 (el segundo sitio de unión al antígeno) se selecciona del grupo que consiste en:

- i. un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y un dominio variable de cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6;
- ii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16;

iii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26; y

iv. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:36.

En una forma de realización preferida, la molécula de unión provista en la presente comprende:

i. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:80 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81;

ii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83;

iii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85; o

iv. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende:

i. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:80, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos

99% de identidad con la SEQ ID NO:80, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:81;

ii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:82, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:83;

iii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 , o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:84, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:85; o

iv. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:86, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:87.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:2 y que contiene la CDR1 de SEQ ID NO:3, la CDR2 de SEQ ID NO:4, y la CDR3 de SEQ ID NO:5, y que comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:6 y que contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:7, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:8, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:9.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:12 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:13, la CDR2 de SEQ ID NO:14, y la CDR3 de SEQ ID NO:15, y comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:16 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:17, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:18, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:19.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:22 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:23, la CDR2 de SEQ ID NO:24, y la CDR3 de SEQ ID NO:25, y comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:26 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:27, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:28, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:29.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:32 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:33, la CDR2 de SEQ ID NO:34, y la CDR3 de SEQ ID NO:35, y comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:36 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:37, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:38, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:39.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:42 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:43, la CDR2 de SEQ ID NO:44, y la CDR3 de SEQ ID NO:45, y comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:46 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:47, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:48, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:49.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:52 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:53, la CDR2 de SEQ ID NO:54, y la CDR3 de SEQ ID NO:55, y comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:56 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:57, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:58, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:59.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:62 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:63, la CDR2 de SEQ ID NO:64, y la CDR3 de SEQ ID NO:65, y comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:66 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:67, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:68, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:69.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:80 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:3, la CDR2 de SEQ ID NO:4, y la CDR3 de SEQ ID NO:5, y comprende una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:81 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:7, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:8, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:9.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:82 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:13, la CDR2 de SEQ ID NO:14, y la CDR3 de SEQ ID NO:15, y comprende una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:83 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:17, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:18, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:19.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:84 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:23, la CDR2 de SEQ ID NO:24, y la CDR3 de SEQ ID NO:25, y comprende una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:85 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:27, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:28, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:29.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:86 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:33, la CDR2 de SEQ ID NO:34, y la CDR3 de SEQ ID NO:35, y comprende una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:87 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:37, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:38, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:39.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:88 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:43, la CDR2 de SEQ ID NO:44, y la CDR3 de SEQ ID NO:45, y comprende una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:89 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:47, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:48, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:49.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:90 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:53, la CDR2 de SEQ ID NO:54, y la CDR3 de SEQ ID NO:55, y comprende una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:91 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:57, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:58, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:59.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:92 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:63, la CDR2 de SEQ ID NO:64, y la CDR3 de SEQ ID NO:65, y comprende una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:93 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:67, la CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:68, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:69.

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la invención, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a TRAILR2 comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:73 (CDR1), SEQ ID NO:74 (CDR2) y SEQ ID NO:75 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:77 (CDR1), SEQ ID NO:78 (CDR2) y SEQ ID NO:79 (CDR3).

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la invención, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a TRAILR2 (el primer sitio de unión al antígeno) es un sitio de unión al antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72 y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a TRAILR2 que comprende un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:72 y contiene la CDR1 de SEQ ID NO:73, la CDR2 de SEQ ID NO:74, y la CDR3 de SEQ ID NO:75, y comprende un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad, respectivamente, con la SEQ ID NO:76 y contiene la CDR1 de la cadena liviana de SEQ ID NO:77, la

CDR2 de la cadena liviana de SEQ ID NO:78, y la CDR3 de la cadena liviana de SEQ ID NO:79.

En algunas formas de realización, las moléculas de unión provistas en la presente, que están definidas por sus secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (por ejemplo, una cadena pesada modificada con un scFv específico de TRAILR2 fusionado con el extremo C terminal de una cadena pesada de Ig) así como su secuencia de aminoácidos de la cadena liviana, comprenden dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, formando de esta manera una estructura tetravalente simétrica y biespecífica.

En aún otra forma de realización preferida, la molécula de unión de la invención comprende una cadena pesada modificada, preferiblemente en donde un scFv específico de TRAILR2 está fusionado al extremo C terminal de una cadena pesada de Ig. Preferiblemente, dicha cadena pesada modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:21, o SEQ ID NO:31. De manera específica, la molécula de unión de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:21, o SEQ ID NO:31.

De manera específica, la molécula de unión de la invención comprende:

i. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81;

ii. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83;

iii. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:21 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85; o

iv. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87.

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la invención, la molécula es biespecífica y tetravalente.

De manera específica, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a TRAILR2 está conectado al por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3.

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la invención, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 es una molécula de inmunoglobulina (Ig) (que tiene la estructura con forma de Y convencional de un anticuerpo de longitud completa con dos cadenas livianas y dos pesadas) y el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a TRAILR2 comprende uno o más scFv.

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la invención, el uno o más scFv tienen una orientación de VL-VH del extremo N al C terminal.

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la invención, el uno o más scFv está fusionado al extremo C terminal de la cadena pesada de la molécula de Ig, formando de esta manera una molécula de Ig modificada. Por ejemplo, un scFv está fusionado al extremo C terminal de una de las cadenas pesadas de la molécula de Ig y un scFv está fusionado al extremo C terminal de la otra cadena pesada de la molécula de Ig. De esta manera, un scFv específico de TRAILR2 está fusionado a cada una de las cadenas pesadas de la molécula de Ig, formando de esta manera una estructura simétrica, biespecífica y tetravalente.

En una forma de realización preferida, la molécula de unión de la invención comprende dos sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica al receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2) y dos sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a cadherina-3 (CDH3).

Por lo tanto, en un aspecto específico, en la presente se provee una molécula de unión biespecífica y tetravalente, en donde la molécula de unión es una molécula de inmunoglobulina (Ig) modificada que comprende dos sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica al receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2) y dos sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a cadherina-3 (CDH3);

en donde los dos sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a CDH3 residen en la región variable (Fv) de la molécula de Ig y los dos sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a TRAILR2 son scFv; y en donde los scFv están fusionados al extremo C terminal de la cadena pesada de la molécula de Ig. Preferiblemente, un primer scFv está

fusionado a una primera cadena pesada y un segundo scFv está fusionado a la segunda cadena pesada de la molécula de Ig, respectivamente.

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la invención, la molécula de Ig es IgG1KO. En otra forma de realización preferida de la molécula de unión de la invención, la molécula de Ig es IgG1FcRnmüt.

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la invención, el uno o más scFv está fusionado a la molécula de Ig mediante un conector peptídico, preferiblemente un conector peptídico que tiene una longitud de entre aproximadamente 4 y 20 aminoácidos (por ejemplo, cualquiera de 5, 6, 9, 12, 15 aminoácidos).

En la presente también se describen moléculas de unión, de manera específica moléculas biespecíficas de unión, que tienen por lo menos un sitio de unión al antígeno (un primer sitio de unión al antígeno) que se une de manera específica a receptor de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2), como se describió con detalle precedentemente, y por lo menos un sitio de unión al antígeno (un segundo sitio de unión al antígeno) que se une de manera específica al dominio extracelular 2 (dominio EC2) de cadherina-3 (CDH3).

En la presente también se provee un anticuerpo que se une de manera específica a CDH3, que comprende:

- i. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:3 (CDR1), SEQ ID NO:4 (CDR2) y SEQ ID NO:5 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3);

ii. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:17 (CDR1), SEQ ID NO:18 (CDR2) y SEQ ID NO:19 (CDR3);

iii. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:23 (CDR1), SEQ ID NO:24 (CDR2) y SEQ ID NO:25 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:27 (CDR1), SEQ ID NO:28 (CDR2) y SEQ ID NO:29 (CDR3);

iv. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:33 (CDR1), SEQ ID NO:34 (CDR2) y SEQ ID NO:35 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) y SEQ ID NO:39 (CDR3);

v. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:43 (CDR1), SEQ ID NO:44 (CDR2) y SEQ ID NO:45 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:47 (CDR1), SEQ ID NO:48 (CDR2) y SEQ ID NO:49 (CDR3);

vi. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:53 (CDR1), SEQ ID NO:54 (CDR2) y SEQ ID NO:55 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:57 (CDR1), SEQ ID NO:58 (CDR2) y SEQ ID NO:59 (CDR3); o

vii. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:63 (CDR1), SEQ ID NO:64 (CDR2) y SEQ ID NO:65 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) y SEQ ID NO:69 (CDR3).

En una forma de realización preferida, el anticuerpo provisto en la presente comprende:

- i. un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y un dominio variable de cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6;
- ii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16;
- iii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26;
- iv. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:36;
- v. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:46;
- vi. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:52 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56; o

vii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:62 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:66.

En aún otra forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo que se une de manera específica a CDH3 comprende:

i. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:80 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81;

ii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83;

iii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85;

iv. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87;

v. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:88 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:89;

vi. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:90 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91; o

vii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:93.

De manera específica, el anticuerpo comprende:

i. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:80, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:80, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:81;

ii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:82, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:83;

iii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 , o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:84, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:85;

iv. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:86, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:87;

v. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:88, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:88, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:89, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:89;

vi. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:90, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:90, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:91; o

vii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:92, y una cadena liviana que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:93, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:93.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo provisto en la presente se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos quiméricos, humanizados, y humanos o fragmentos de anticuerpo, y scFv, fragmentos Fab, fragmentos de anticuerpo monovalentes y fragmentos F(ab')₂.

Otro aspecto de la invención provee una molécula de ácido nucleico que codifica para una molécula de unión de la invención o un vector de expresión que contiene dicha molécula de ácido nucleico.

En una forma de realización preferida, dicho vector es un plásmido o un vector viral.

Otro aspecto de la invención provee una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención en asociación funcional con una secuencia de control la expresión.

En la presente también se provee una célula huésped que comprende un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para una molécula de unión como se describe en la presente.

Otro aspecto de la invención provee un método para elaborar una molécula de unión de la invención, que comprende

- i. cultivar la célula huésped de la reivindicación 17 en condiciones que permiten la expresión de la molécula, y
- ii. recuperar la molécula, y opcionalmente
- iii. purificar y/o modificar y/o formular de manera adicional la molécula.

En la presente también se provee la molécula de unión de la invención, para usar en medicina.

En una forma de realización preferida, la molécula de unión de la invención se provee para usar en el tratamiento de cáncer, preferiblemente cáncer de páncreas, cáncer de pulmón o cáncer de cabeza y cuello.

En la presente también se provee una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente uno o más ingredientes activos adicionales.

Otro aspecto de la invención provee un método para el tratamiento de cáncer que comprende administrar una cantidad eficaz de una molécula de unión de la invención a un paciente que lo requiere.

En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica provista en la presente se liofiliza, se estabiliza y/o se formula para la administración mediante inyección.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1: Secuencias de aminoácidos de CDH3.

Figura 2: Expresión de CDH3 y TRAILR2. La expresión de proteína y localización en membrana en relación con la expresión de ARNm para TRAILR2 y CDH3 se demuestra en PDX derivados de cáncer colorrectal (A y B). Además, la tinción en membrana de CDH3 y TRAILR2 se muestra en tejidos tumorales de cirugía de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y carcinoma de células escamosas de esófago (C).

Figura 3: Representación esquemática del diseño de la molécula. Se describe un ejemplo de una molécula de unión de la invención que comprende

(i) una molécula de Ig que se une de manera específica a CDH3, que comprende dos cadenas pesadas y dos livianas, y (ii) dos moléculas de scFv que se unen de manera específica a TRAILR2. El extremo N terminal de un scFv está fusionado al extremo C terminal de cada una de las cadenas pesadas de la molécula de Ig, formando de esta manera una molécula similar a anticuerpo simétrica, biespecífica y tetravalente.

Figura 4: Análisis de citometría de flujo de la expresión proteica en superficie de TRAILR2 y CDH3 en células GP2d. Los resultados se muestran como la intensidad media de la fluorescencia.

Figura 5: Efecto de la incubación de los anticuerpos sobre la viabilidad celular. Se trataron células GP2d durante 24h con diferentes concentraciones de (i) molécula biespecífica para CDH3/TRAILR2 (CDH3/TR2v1), (ii) anti-TRAILR2 solo (Lexatumumab), (iii) anti-CDH3v1 (o anti-CDH3v2) solo, o (iv) la combinación equivalente de los anticuerpos anti-TRAILR2 (Lexatumumab) y anti-CDH3v1 (o anti-CDH3v2) por separado. Los datos se expresan como valores medios relativos comparados contra el control sin tratar.

Figura 6: Efecto de la incubación de los anticuerpos sobre la viabilidad celular. Se trataron células GP2d durante 24h con diferentes concentraciones de (i) moléculas biespecíficas de CDH3/TRAILR2 que se unen en el **EC1 de CDH3** (CDH3/TRAILR2v1, CDH3/TRAILR2v2, CDH3/TRAILR2v3, CDH3/TRAILR2v7) o (ii) anti-TRAILR2 solo (nanobody anti-TRAILR2). Los datos se expresan como valores medios relativos comparados contra el control sin tratar.

Figura 7: Efecto de la incubación de los anticuerpos sobre la viabilidad celular. Se trataron células GP2d durante 24h con diferentes

concentraciones de (i) moléculas biespecíficas de CDH3/TRAILR2 que se unen en el **EC2 de CDH3** (CDH3/TRAILR2v4, CDH3/TRAILR22v5, CDH3/TRAILR2v6) o (ii) anti-TRAILR2 solo (nanobody anti-TRAILR2). Los datos se expresan como valores medios relativos comparados contra el control sin tratar.

Figura 8: Análisis de citometría de flujo de la expresión proteica en superficie de TRAILR2 y CDH3 en células GP2d con noqueo de CDH3 generadas mediante CRISPR/Cas9. Los resultados se muestran como la intensidad media de fluorescencia.

Figura 9: Efecto de la incubación de los anticuerpos sobre la viabilidad celular en ausencia de la diana CDH3. Se trataron células GP2d (con noqueo de CDH3) durante 24h con diferentes concentraciones de (i) una molécula biespecífica para CDH3/TRAILR2 ejemplificativa de la invención, (ii) anti-TRAILR2 solo (Lexatumumab), (iii) anti-CDH3v1 solo, (iv) anti-CDH3v2 solo, o (iv) la combinación equivalente de los anticuerpos anti-TRAILR2 (Lexatumumab) y anti-CDH3v1 (o anti-CDH3v2) por separado. Los datos se expresan como valores medios relativos comparados contra el control sin tratar.

Figura 10: Efecto de la incubación de los anticuerpos sobre la viabilidad celular en ausencia de CDH3. Se trataron células GP2d (con noqueo de CDH3) durante 24h con diferentes concentraciones de (i) moléculas biespecíficas de CDH3/TRAILR2 de unión a EC1 (CDH3/TR2v1, CDH3/TR2v2, CDH3/TR2v3) o (ii) anti-TRAILR2 solo (nanobody anti-TRAILR2). Los datos se expresan como valores medios relativos comparados contra el control sin tratar.

Figura 11: Efecto de la incubación de los anticuerpos sobre la viabilidad celular en ausencia de CDH3. Se trataron células GP2d (con noqueo

de CDH3) durante 24h con diferentes concentraciones de (i) moléculas biespecíficas de CDH3/TRAILR2 de unión a EC2 (CDH3/TR2v4, CDH3/TR2v5, CDH3/TR2v6) o (ii) anti-TRAILR2 solo (nanobody anti-TRAILR2). Los datos se expresan como valores medios relativos comparados contra el control sin tratar.

Figura 12: Efecto de la incubación de los anticuerpos sobre la viabilidad celular en un modelo de cultivo de células en 3D. Se trataron células NCI-H358 durante 48h con diferentes concentraciones de (i) molécula biespecífica para CDH3/TRAILR2 (CDH3/TR2v1), (ii) anti-TRAILR2 solo (Lexatumumab), (iii) anti-CDH3v1 (o anti-CDH3v2) solo, o (iv) la combinación equivalente de los anticuerpos anti-TRAILR2 (Lexatumumab) y anti-CDH3v1 (o anti-CDH3v2) por separado. Los datos se expresan como valores medios relativos comparados contra el control sin tratar.

Figura 13: Efecto de la incubación de los anticuerpos sobre la viabilidad celular en un modelo de cultivo de células en 3D. Se trataron células NCI-H358 durante 48h con diferentes concentraciones de (i) moléculas biespecíficas anti-TRAILR2/CDH3 de unión a EC1 (CDH3/TR2v1, CDH3/TR2v2, CDH3/TR2v3) o (ii) anti-TRAILR2 solo (nanobody anti-TRAILR2). Los datos se expresan como valores medios relativos comparados contra el control sin tratar.

Figura 14: Efecto de la incubación de los anticuerpos sobre la viabilidad celular en un modelo de cultivo de células en 3D. Se trataron células NCI-H358 durante 48h con diferentes concentraciones de (i) moléculas biespecíficas de CDH3/TRAILR2 de unión a EC2 (CDH3/TR2v4, CDH3/TR2v5, CDH3/TR2v6) o (ii) anti-TRAILR2 solo (nanobody anti-TRAILR2). Los datos se expresan como valores medios relativos comparados contra el control sin tratar.

Figura 15: Análisis de inducción de apoptosis (ensayo de activación de caspasa 8) después de la incubación del anticuerpo. Se trataron células GP2d durante 7h con diferentes concentraciones de (i) una molécula biespecífica de unión a CDH3/TRAILR2 ejemplificativa de la invención, o moléculas anti-TRAILR2 (ii) nanobody anti-TRAILR2 o (iii) Lexatumumab y se midió la activación de Caspasa-8. Los datos se expresan como valores medios relativos de las veces de cambio en comparación con el control sin tratar.

Figura 16: Datos *in vivo* en el modelo de xenoinjerto de GP2d. Eficacia *in vivo* de moléculas biespecíficas que reconocen TRAILR2 de humano y CDH3 de humano: Las moléculas anti-CDH3/TRAILR2 de unión a EC1 CDH3/TRAILR2v1 (círculos negros), CDH3/TRAILR2v2 (cuadrados negros), CDH3/TRAILR2v3 (triángulos negros) o las moléculas anti-CDH3/TRAILR2 de unión a EC2 CDH3/TRAILR2v4 (círculos blancos), CDH3/TRAILR2v5 (cuadrados blancos), y CDH3/TRAILR2v6 (triángulos blancos) o control vehículo (cruces grises) se administraron a ratones que portaban las células tumorales GP2d. Se midió el volumen tumoral (mm³) después de la administración en los días indicados. Los datos se expresan como la mediana de los volúmenes de tumor. Se incluyeron por lo menos 8 animales en cada uno de los grupos.

Figura 17: Internalización de los anticuerpos anti-CDH3/TRAILR2 de unión a EC1 y de unión al antígeno individual. Se expusieron células GP2d con noqueo de caspasa 8 a anticuerpos marcados con Fabfluor 1 nM: Una molécula anti-CDH3/TRAILR2 de unión a EC1 ejemplificativa (círculos blancos), una molécula anti-CDH3 de unión a EC1 ejemplificativa (círculos blancos con cruces), la molécula de unión a TRAILR2 Lexatumumab (cuadrados blancos), o, como un control positivo casero para la internalización moderada, la molécula de

unión a CDH3 disponible comercialmente (MAB861, bio-techné®, R&D systems) (círculos negros). Se analizaron los recuentos de Fabfluor por imagen como una medida cuantitativa de la internalización después de la administración del anticuerpo a las horas indicadas. Se muestra la media de las medidas. Las barras de error indican la desviación estándar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal como se describió precedentemente, un abordaje para tratar el cáncer ha sido inducir la apoptosis en una célula cancerosa mediante el uso de moléculas que se unen de manera específica y activan a la vía apoptótica mediada por el receptor inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL). Tal como se muestra en muchos estudios preclínicos, la señalización de TRAIL induce de manera eficaz la apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales pero no en la mayoría de las células normales. Sin embargo, también se ha informado que los tejidos normales, especialmente los hepatocitos en el hígado, son susceptibles a este mecanismo de inducción de apoptosis.

El TRAIL se une con alta afinidad a cuatro receptores de la superficie celular diferentes. Dos de ellos, TRAILR1 y TRAILR2, tienen la capacidad de gatillar la apoptosis inducida por TRAIL a través de la interacción de su dominio de muerte intracelular con diferentes proteínas adaptadoras y pro-caspasa 8. El agrupamiento de las moléculas TRAILR1 o TRAILR2 mediante el ligando TRAIL facilita la escisión autocatalítica y la activación de la pro-caspasa 8 que a su vez lleva a la inducción de la apoptosis. TRAILR3 y TRAILR4 son receptores señuelo, y si bien sus dominios extracelulares tienen la capacidad de unirse a TRAIL, las partes intracelulares de los receptores no contienen un dominio con capacidad de inducir la apoptosis al unirse a TRAIL.

La sobreexpresión de los receptores TRAIL señuelo puede hacer que las células cancerosas se vuelvan insensibles a la presencia del ligando TRAIL. El direccionamiento específico de los receptores TRAIL no señuelo inductores de apoptosis evita este problema y representa un tratamiento más eficaz de los tumores.

La presente invención se enfoca en el desarrollo de moléculas agonistas de TRAILR2. El TRAILR2 se expresa ampliamente en un espectro grande de cánceres. Se han desarrollado diferentes anticuerpos agonistas específicos de TRAILR2 que incluyen Lexatumumab (HGS-ETR2) para el tratamiento de cáncer. Sin embargo, estos anticuerpos agonistas carecen de eficacia en la clínica. Sin pretender de estar limitado por la teoría, se cree que probablemente se deba a una falta de agrupamiento suficiente del receptor TRAILR2, y por ello la falla para inducir la apoptosis de manera eficaz en las células cancerosas.

En un intento diferente de promover la apoptosis mediada por TRAILR2 en células cancerosas, se ha desarrollado un nanobody tetramérico de unión a TRAILR2, TAS266. En experimentos preclínicos demostró una eficacia antitumoral superior a los anticuerpos dirigidos anti-TRAILR2 convencionales. Sin embargo, se ha informado que los hepatocitos en el hígado pueden ser sensibles a la apoptosis mediada por TRAILR2 y por lo tanto un aumento no dirigido del agrupamiento de TRAILR2, como es promovido por TAS266, tiene el riesgo de potencial toxicidad. De hecho, el ensayo clínico de Fase I de TAS266 ha sido terminado.

Por lo tanto, si se usa una molécula que actúa como agonista de la vía de manera muy eficaz, entonces se pueden inducir efectos secundarios severos ya que se induce apoptosis en células no cancerosas. Por otra parte, si solo se usan

moléculas débilmente agonistas se ha mostrado que estas tienen una pobre actividad anticancerígena, a pesar de ser bien toleradas.

Un abordaje es combinar el direccionamiento del receptor TRAIL con un marcador específico de célula cancerosa, es decir una proteína que no se expresa o que se expresa poco en las células no cancerosas, también llamada “proteína de anclaje” (véase por ejemplo, WO 2018/115231 A2 en donde se usa CDH17 como proteína de anclaje). Sin embargo, dichas proteínas diana específicas de tumor son raras y esta escasez permanece como una desventaja principal encontrada habitualmente en el desarrollo de fármacos terapéuticos específicos de cáncer. Si bien se han realizado intentos para atacar antígenos de linaje más ampliamente distribuidos, la importancia de estas terapias ha sido limitada por las toxicidades provocadas por la expresión de estos antígenos en ciertos tejidos normales, tal como por ejemplo, la expresión de Epcam en el tracto gastrointestinal (Kebenko y col., Oncoimmunology 2018, Vol. 7, No. 8). Si bien actualmente se están persiguiendo diferentes abordajes para reducir las toxicidades relacionadas con la expresión del antígeno fuera de sitio, las toxicidades aún permanecen limitadas por la dosis para muchos compuestos.

Los inventores han identificado proteínas de anclaje que no se encuentran presentes en cantidades sustanciales en el suero y que se localizan en células cancerosas las cuales se coexpresan con el TRAILR2. Es importante que, las proteínas de anclaje seleccionadas no se expresan en el hígado, que se considera que sea ventajoso debido a la potencial toxicidad hepática descrita precedentemente.

Los presentes inventores identificaron a cadherina-3 como una diana de anclaje adecuada que se puede usar en combinación con una molécula de unión al receptor TRAIL.

La cadherina-3 (CDH3) es un miembro de la superfamilia de cadherina, genes que codifican para glicoproteínas asociadas a membrana dependientes de calcio. La proteína codificada es similar a cadherina, que consiste en una región extracelular, que contiene 5 dominios cadherina, una región transmembrana, y un dominio intracelular.

Los inventores analizaron la expresión de CDH3 en tejidos tumorales y descubrieron que el TRAILR2 y CDH3 se coexpresan en una variedad de tumores (es decir, cáncer de páncreas (PAC), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de mama triple negativo, cáncer de ovario, melanoma de piel, y en cáncer urotelial y de cuello uterino), con poca o nada de coexpresión en las células no cancerosas. Notablemente, la CDH3 no fue detectable en tejido hepático normal o hepatocitos con sensibilidad informada de activación de TRAILR2.

Por lo tanto, en la presente se proveen moléculas de unión que incluyen por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a TRAILR2 y por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3.

En los datos experimentales anexos, se puede observar que dichas moléculas tienen la capacidad de inducir apoptosis *in vitro* e *in vivo* en células en las cuales se expresan CDH3 y TRAILR2. Sorprendentemente, las moléculas de unión biespecíficas que se unen a TRAILR2 y al dominio EC1 de CDH3 inducen la apoptosis significativamente de manera más eficaz que dichas moléculas de

unión biespecíficas dirigidas de manera específica contra el dominio EC2 de CDH3, tal como lo demuestran de manera impresionante los datos *in vivo* que se muestran en el Ejemplo 6.

Es importante que, como se muestra también en los ejemplos, las mismas moléculas esencialmente no inducen apoptosis en células que expresan a TRAILR2 pero no a CDH3. Por lo tanto las moléculas de unión de la presente invención son terapéuticamente eficaces para los cánceres en los cuales las células cancerosas expresan CDH3 y TRAILR2. En un aspecto, las moléculas de unión de la presente invención no afectan a las células hepáticas negativas para CDH3, reduciendo de esta manera el riesgo de toxicidad hepática.

Además, las moléculas de unión de la presente invención son muy estables en condiciones de pH bajo, permitiendo la producción eficaz en grandes cantidades y por lo tanto haciéndolas excelentes candidatas de proteínas terapéuticas.

Notablemente, las moléculas de unión de la presente invención esencialmente no muestran actividad de internalización en un ensayo representativo. Tal como se muestra en el Ejemplo 7, la internalización no fue medible para una molécula de unión ejemplificativa específica para CDH3/TRAILR2 EC1. Una pequeña o muy lenta internalización es ventajosa para soportar una activación duradera y eficaz de TRAILR2 en la superficie celular para las moléculas biespecíficas de unión de la invención.

Por lo tanto las moléculas de unión de la invención anti-CDH3/TRAILR2 tienen ventajas claras respecto a otras moléculas conocidas en el arte y ofrecen utilidad para tratar el cáncer, que incluye cáncer de páncreas, cánceres de cabeza y cuello y cánceres de pulmón. Algunas de estas ventajas incluyen

eficacia *in vivo* mejorada, menos efectos secundarios, alta estabilidad y facilidad mejorada de elaboración; especialmente en comparación con moléculas ya conocidas en el arte.

El primer aspecto de la invención provee una molécula de unión que tiene por lo menos un sitio de unión al antígeno (un primer sitio de unión al antígeno) que se une de manera específica a receptor de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2) y por lo menos un sitio de unión al antígeno (un segundo sitio de unión al antígeno) que se une de manera específica a cadherina-3 (CDH3), preferiblemente al dominio EC1 de CDH3.

Hasta la presente invención no se había descrito ni incluso contemplado remotamente para preparar moléculas de unión que se puedan unir de manera específica a TRAILR2 y CDH3, de manera específica, al dominio EC1 de CDH3. No obstante, individualmente, cada proteína y sus genes asociados son conocidos en el arte y están bien representados en las bases de datos biológicas.

Para evitar cualquier duda, con el término “receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2)” los inventores se refieren a la proteína humana provista en UniProt O14763 <http://www.uniprot.org/uniprot/O14763>, y la secuencia de ácido nucleico que codifica para esa proteína.

Para evitar cualquier duda, con el término “cadherina-3 (CDH3)” los inventores se refieren a la proteína humana provista en UniProt P22223 <http://www.uniprot.org/uniprot/P22223>, y la secuencia de ácido nucleico que codifica para esa proteína.

La presente invención se relaciona con moléculas de unión que tienen especificidades de unión por al menos dos dianas diferentes. En relación a la

presente invención, las moléculas de unión derivan de anticuerpos. Las técnicas para elaborar las moléculas de unión incluyen, a título enunciativo no taxativo, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena liviana de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker y col., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), y diseño "botón en ojal" (véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. No. 5.731.168). Las moléculas de unión de la invención también pueden ser elaboradas mediante el diseño de efectos de impedimento electrostático para elaborar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (WO2009/089004A1); entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. No. 4.676.980, y Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985)); usando cierres de leucina para elaborar anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny y col., *Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); usando tecnología de "diabody" para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444- 6448 (1993)); y usando dímeros de Fv de cadena única (scFv) (véase, por ejemplo, Gruber y col., *Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt y col. *Immunol.* 147: 60 (1991).

A los términos no definidos de manera específica en la presente se les debe dar el significado que les daría un experto en el arte a la luz de la divulgación y del contexto. Tal como se usa en la memoria descriptiva, sin embargo, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado y se cumplen las siguientes convenciones.

Términos y definiciones utilizados

Se dice que una molécula (por ejemplo la molécula de unión de la invención, o un fragmento de la misma) que se puede "unir", "unir a", "unir específicamente" o "unir específicamente a", que "tenga afinidad por" y/o que "tiene especificidad por" cierto epítipo, antígeno o proteína (o por al menos una parte, fragmento o epítipo del mismo) es "contra" o está "dirigida contra" dicho epítipo, antígeno o proteína o que es una molécula "de unión" con respecto a dicho epítipo, antígeno o proteína. Tal como se lo usa en la presente, cuando el término "biespecífico" se refiere a una molécula de unión, se refiere a una molécula (por ejemplo la molécula de unión de la invención) que se puede unir específicamente o que tiene especificidad por al menos dos antígenos o proteínas diferentes (o por al menos una parte, fragmento o epítipo del mismo).

Tal como se lo usa en la presente, el término "sitio de unión al antígeno", se refiere a un dominio de una molécula de unión que confiere la capacidad de unirse a un antígeno específico. Los sitios de unión al antígenos se derivan originalmente de anticuerpos, aunque los avances en este campo han llevado a posibilidades adicionales de diseño y/u obtención de sitios de unión al antígenos sin necesidad de generar un anticuerpo natural contra la diana de interés. Independientemente de su origen, de acuerdo con la presente invención un "sitio de unión al antígeno" comprende por lo menos los elementos estructurales mínimos, es decir, los elementos estructurales necesarios y suficientes, que permiten la unión a su antígeno diana específico. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención un "sitio de unión al antígeno" comprende por lo menos tres secuencias de la CDR de la cadena pesada (en el caso de anticuerpos de dominio único), de manera más preferible por lo menos tres secuencias de la CDR de la cadena liviana y tres de la cadena pesada. Como se analiza más

adelante, estas CDR normalmente residen en el denominado dominio variable o región variable (Fv) de un anticuerpo. Se apreciará que mientras que un sitio de unión al antígeno comprende por lo menos los elementos estructurales mínimos, normalmente abarca elementos adicionales (como, por ejemplo, las regiones marco). Por lo tanto, tal como se lo utiliza de acuerdo con la presente invención, un sitio de unión al antígeno también se puede definir mediante las secuencias de la combinación respectiva del dominio variable de la cadena pesada y del dominio variable de la cadena liviana. De acuerdo con la presente invención se prefiere en particular que un "sitio de unión al antígeno" esté comprendido en un polipéptido y/o que cada una de dichas CDR o dichos dominios variables sea(n) polipéptido(s) o péptido(s).

Los "anticuerpos" o "moléculas de inmunoglobulina" (que también se conocen como inmunoglobulinas, y se abrevian como Ig) son proteínas de gamma globulina que se pueden encontrar en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados y que el sistema inmunitario utiliza para identificar y neutralizar objetos extraños, como las bacterias y virus. Por lo general, están formados por unidades estructurales básicas, cada una de las cuales cuenta con dos cadenas pesadas grandes y dos cadenas livianas pequeñas, para formar, por ejemplo, monómeros con una unidad, dímeros con dos unidades o pentámeros con cinco unidades. Los anticuerpos se pueden unir, mediante interacción no covalente, a otras moléculas o estructuras conocidas como antígenos. Esta unión es específica en el sentido de que un anticuerpo solo se unirá con alta afinidad a una estructura específica. La parte peculiar del antígeno que reconoce un anticuerpo se denomina epítopo o determinante antigénico. La parte del anticuerpo que se une al epítopo a veces se denomina paratope y

reside en el denominado dominio variable o región variable (Fv) del anticuerpo. El dominio variable comprende tres regiones que se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR), separadas por regiones marco (FR).

Dentro del contexto de la presente invención, la referencia a las CDR se basa en la definición de Kabat (E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller y H. Perry, *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda (1983)). Una definición alternativa de CDR se basa en (i) CCG (Chemical Computing Group, según se ilustra en Almagro y col., *Proteins* 2011; 79: 3050-3066 y Maier y col., *Proteins* 2014; 82: 1599-1610), (ii) Chothia (Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917), (iii) IMGT (Lefranc MP, *Dev Comp Immunol.* 27 de enero de 2003; (1):55-77) y (iv) North (North B, *J Mol Biol.* (2011) 406:228–56).

Tal como se las usa en la presente, las expresiones "dominios variables" o "región variable" o Fv, indican cada par de cadenas livianas y pesadas que están involucradas directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. El dominio variable de una cadena liviana se abrevia como "VL" y el dominio variable de una cadena pesada se abrevia como "VH". Los dominios variables de cadenas livianas y pesadas tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres HVR (o CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación de hoja (o láminas) beta y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de las hojas beta. Las CDR de cada cadena conservan su estructura tridimensional por las regiones marco y junto con las CDR de la otra cadena forman el sitio de unión al antígeno. Las regiones CDR

de las cadenas liviana y pesada del anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y por lo tanto proveen un objeto adicional de la invención.

Un dominio de inmunoglobulina consiste esencialmente en cuatro "regiones marco" a las cuales en el arte y en lo sucesivo en la presente se hace referencia como "región marco 1" o "FR1"; como "región marco 2" o "FR2"; como "región marco 3" o "FR3"; y como "región estructural 4" o "FR4", respectivamente; donde dichas regiones marco están interrumpidas por tres "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR", a las cuales en el arte y en lo sucesivo en la presente se hace referencia como "región determinante de complementariedad 1" o "CDR1"; como "región determinante de complementariedad 2" o "CDR2"; y como "región determinante de complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente. Así, la estructura general o secuencia de un dominio variable de inmunoglobulina se puede indicar de la siguiente manera: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Los dominios variables de inmunoglobulina son quienes confieren especificidad por el antígeno a un anticuerpo porque contienen el sitio de unión al antígeno.

Tal como se los usa en la presente solicitud, los términos "dominios constantes" o "región constante", indican la suma de los dominios de un anticuerpo distintos de la región variable. Dichos dominios y regiones constantes son bien conocidos en el estado actual de la técnica y por ejemplo han sido descritos por Kabat y col. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publicación N° 91).

La "parte Fc" de un anticuerpo no participa directamente en la unión de un

anticuerpo a un antígeno, pero exhibe diversas funciones efectoras. Una "parte Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido por los especialistas en la materia y se define en base a la escisión de anticuerpos por la papaína. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. De acuerdo con las regiones constantes de la cadena pesada, las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ respectivamente. Varios de estos se pueden dividir en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. La parte Fc de un anticuerpo participa directamente en la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) en base a la activación del complemento, la unión de C1q y la unión del receptor de Fc. La activación del complemento (CDC) se inicia mediante la unión del factor del complemento C1q a la parte Fc de la mayor parte de las subclases de anticuerpos IgG. Si bien la influencia de un anticuerpo en el sistema del complemento depende de ciertas condiciones, la unión a C1q es causada por sitios de unión definidos en la parte Fc. Dichos sitios de unión son conocidos en el estado actual de la técnica y han sido descritos, por ejemplo, por Boakle y col., *Nature* 282 (1975) 742-743, Lukas y col., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560, Brunhouse y Cebra, *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917, Burton y col., *Nature* 288 (1980) 338-344, Thommesen y col., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004, Idusogie y col., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184, Hezareh y col., *J. Virology* 75 (2001) 12161-12168, Morgan y col., *Immunology* 86 (1995) 319-324, EP 0307434. Dichos sitios de unión son, por ejemplo L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice UE de

Kabat, véase más adelante). Los más cruciales entre estos residuos en la mediación de la unión del receptor C1q y Fc γ en IgG1 son L234 y L235 (Hezareh y col., J. Virology 75 (2001) 12161-12168). Los anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG3 suelen mostrar activación del complemento y unión a C1q y C3, mientras que IgG2 e IgG4 no activan el sistema del complemento y no se unen a C1q y C3.

En este campo los anticuerpos se han desarrollado adicionalmente y se los ha convertido en herramientas versátiles en medicina y tecnología. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, los términos "molécula de unión", "molécula de anticuerpo" o "anticuerpo" no solo incluyen a los anticuerpos tal como se los puede encontrar en la naturaleza, que comprenden, por ejemplo, dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas, o sólo dos cadenas pesadas como en las especies de camélidos, sino que además abarca a todas las moléculas que comprenden por lo menos un paratope con especificidad de unión a un antígeno y similitud estructural con un dominio variable de una inmunoglobulina.

En la presente, los términos "anticuerpo" y "molécula de anticuerpo" se usan como sinónimos.

Por lo tanto, un anticuerpo puede comprender un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un fragmento de un anticuerpo, en particular un fragmento Fv, Fab, Fab' o F(ab')₂, un anticuerpo monocatenario, en particular un fragmento variable de cadena simple (scFv), un inmunofármaco modular pequeño (SMIP), un anticuerpo de dominio, un *nanobody* y/o un *diabody*. El anticuerpo puede tener una función efectora, como ADCC o CDC, que normalmente está mediada por la parte Fc (región constante del anticuerpo) del anticuerpo, o puede no tener función

efectora, por ejemplo al carecer de una parte Fc o tener una parte Fc bloqueada, enmascarada, en esencia una parte Fc que no es reconocida por las células inmunitarias o los componentes del sistema inmunitario, como el sistema del complemento o que lo es de manera insuficiente. Los anticuerpos monoclonales (mAb) son anticuerpos monoespecíficos, cuyas secuencias de aminoácidos son idénticas. Se pueden producir mediante tecnología de hibridoma a partir de una línea celular híbrida (llamada hibridoma) que representa un clon de una fusión de una célula B productora de anticuerpos específicos con una célula de mieloma (cáncer de células B) (Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-7). Como alternativa, los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante expresión recombinante en células huésped (Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (mayo de 1997). "Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells." *J Immunol Methods* 204 (1): 77–87; véase también más adelante en la presente). Un "anticuerpo recombinante" o "molécula de unión recombinante" es un anticuerpo o molécula de unión que ha sido producido por una célula huésped modificada por ingeniería recombinante. Opcionalmente se aísla o purifica.

Los anticuerpos policlonales representan una colección de moléculas de anticuerpos con diferentes secuencias de aminoácidos y se pueden obtener de la sangre de vertebrados después de la inmunización con el antígeno mediante procesos bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) son anticuerpos monoespecíficos cuyas secuencias de aminoácidos son idénticas. Los mismos se pueden producir mediante tecnología de hibridomas a partir de una línea celular híbrida (que se

denomina hibridoma) que representa un clon de una fusión de una célula B productora de anticuerpos específicos con una célula de mieloma (cáncer de células B) (Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-7). Como alternativa, los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante expresión recombinante en células huésped (Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (mayo de 1997). " Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells ".*J Immunol Methods* 204 (1): 77–87; véase también más adelante).

Para su aplicación en el ser humano, frecuentemente es deseable reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos derivados originalmente de otras especies, por ejemplo de ratón. Esto se puede hacer mediante la construcción de anticuerpos quiméricos o mediante un proceso denominado "humanización". En este contexto, se entiende que un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo que comprende una parte de la secuencia (por ejemplo, un dominio variable) derivada de una especie (por ejemplo, de ratón) fusionada con una parte de la secuencia (por ejemplo, los dominios constantes) derivada de una especie diferente (por ejemplo, de ser humano). Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende un dominio variable que originalmente se derivó de una especie no humana, en el que ciertos aminoácidos han sido mutados para hacer que la secuencia general de ese dominio variable se asemeje más a una secuencia de un dominio variable humano. Los métodos de quimerización y humanización de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (Billetta R, Lobuglio AF. "Chimeric antibodies". *Int Rev Immunol.* 1993; 10(2-3):165-76; Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988). "Reshaping human

antibodies for therapy", Nature: 332:323). Tal como se lo usa en la presente, el término "anticuerpos humanos", se refiere a anticuerpos que se crearon en base a secuencias derivadas del genoma humano, por ejemplo mediante presentación en fagos o mediante el uso de animales transgénicos (véase, por ejemplo, WO 90/05144). Tal como se lo usa en la presente, el término "anticuerpo", incluye explícitamente a dichos anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, así como a los anticuerpos humanos.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo que comprende residuos de aminoácidos de regiones hipervariables no humanas (HVR) y residuos de aminoácidos de FR humanos. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente de dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los HVR (por ejemplo, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR)) corresponden a los de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las regiones marco (FR) corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender por lo menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha humanizado.

Además, se han desarrollado tecnologías para crear anticuerpos basados en secuencias derivadas del genoma humano, por ejemplo, mediante presentación en fagos o uso de animales transgénicos (WO 90/05144; D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths y G. Winter (1991) "By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on

phage" J. Mol. Biol., 222, 581-597; Knappik y col., J. Mol. Biol. 296: 57-86, 2000; S. Carmen y L. Jermutus, "Concepts in antibody phage display", Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2002 1 (2): 189-203; Lonberg N, Huszar D. "Human antibodies from transgenic mice", Int Rev Immunol. 1995; 13(1):65-93.; Brüggemann M, Taussig MJ. "Production of human antibody repertoires in transgenic mice", Curr Opin Biotechnol., agosto de 1997; 8(4):455- 8). En el contexto de la presente invención dichos anticuerpos son "anticuerpos humanos".

El término "anticuerpo", en particular las moléculas de anticuerpo que se describen en la presente, también puede incluir fragmentos de inmunoglobulinas que retienen propiedades de unión al antígeno, tales como los fragmentos Fab, Fab' o F(ab')₂. Dichos fragmentos se pueden obtener por fragmentación de inmunoglobulinas, por ejemplo mediante digestión proteolítica, o por expresión recombinante de dichos fragmentos. Por ejemplo, la digestión de inmunoglobulinas se puede realizar por medio de técnicas de rutina, por ejemplo usando papaína o pepsina (WO 94/29348). La digestión con papaína de los anticuerpos normalmente produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, los denominados fragmentos Fab, cada uno con un solo sitio de unión al antígeno y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un F(ab')₂. En las moléculas Fab, cada uno de los dominios variables está fusionado con un dominio constante de inmunoglobulina, preferiblemente de origen humano. Por tanto, el dominio variable de la cadena pesada se puede fusionar con un dominio CH1 (el denominado fragmento Fd), y el dominio variable de la cadena liviana se puede fusionar con un dominio CL. Las moléculas de Fab se pueden producir mediante la expresión recombinante de los respectivos ácidos

nucleicos en las células huésped, véase más adelante.

Se han desarrollado diversas tecnologías para colocar dominios variables de inmunoglobulinas, o moléculas derivadas de dichos dominios variables, en un contexto molecular diferente. De acuerdo con la presente invención, los mismos también se deben considerar "anticuerpos". Por lo general, estas moléculas de anticuerpo tienen un tamaño más pequeño en comparación con las inmunoglobulinas y pueden comprender una sola cadena de aminoácidos o diversas cadenas de aminoácidos. Por ejemplo, un fragmento variable monocatenario (scFv) es una fusión de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de las inmunoglobulinas, unidas entre sí por un conector corto, normalmente serina (S) o glicina (G) (WO 88/01649, WO 91/17271, Houston y otros, International Reviews of Immunology, Volumen 10, 1993, 195 - 217). Los "anticuerpos de un solo dominio" o "*nanobodies*" albergan un sitio de unión al antígeno en un solo dominio similar a Ig (WO 94/04678; WO 03/050531, Ward y col., Nature, 12 de octubre de 1989; 341 (6242): 544- 6; Revets y col., Expert Opin Biol Ther. 5(1):111-24, 2005). Uno o más anticuerpos de un solo dominio con especificidad de unión para el mismo antígeno o uno diferente se pueden unir entre sí. Los *diabodies* son moléculas de anticuerpos bivalentes que consisten en dos cadenas de aminoácidos que comprenden dos dominios variables (WO 94/13804, Holliger y col., Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jul 15; 90(14):6444-8). Otros ejemplos de moléculas similares a anticuerpos son los anticuerpos de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF; Srinivasan y Roeske, Current Protein Pept. Sci. 2005, 6(2): 185-96). Un concepto diferente conduce al denominado inmunofármaco modular pequeño (SMIP) que comprende un dominio Fv unido a dominios efectores y bisagra de cadena simple desprovistos

del dominio constante CH1 (documento WO 02/056910).

Una molécula de anticuerpo puede estar fusionada (por ejemplo una proteína de fusión) o unida de otra manera (mediante enlaces covalentes o no covalentes) a otras entidades moleculares, tales como fármacos citotóxicos o entidades que tengan un impacto deseado sobre las propiedades de la molécula de anticuerpo. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar las propiedades farmacocinéticas de las moléculas de anticuerpo, la estabilidad, por ejemplo en fluidos corporales tales como la sangre, en particular en el caso de anticuerpos monocatenarios o anticuerpos de un solo dominio. A este respecto se han desarrollado una serie de tecnologías, en particular para prolongar la vida media de dichas moléculas de anticuerpo en la circulación, por ejemplo en la PEGilación (WO 98/25971; WO 98/48837; WO 2004081026), fusión u otro tipo de unión covalente de la molécula de anticuerpo a otra molécula de anticuerpo que tiene afinidad por una proteína sérica como la albúmina (WO 2004041865; WO 2004003019), o la expresión de la molécula de anticuerpo como proteína de fusión con la totalidad o parte de una proteína sérica como la albúmina o la transferrina (WO 01/79258). Los medios y métodos para la identificación de secuencias directrices y la optimización de secuencias directrices en el diseño de anticuerpos son bien conocidos en la técnica y han sido revisados, por ejemplo, en Goulet, D.R. y Atkins, W. M. J Pharm Sci 2020; 109(1):74-103 o Tiller, K. E., & Tessier, P. M. (2015), Annual review of biomedical engineering, 17, 191–216.

Con respecto a la presente invención, el primer aspecto de la invención provee una molécula de unión que comprende por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une específicamente al receptor 2 del ligando inductor de

apoptosis relacionado con TNF (TRAILR2) y por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a la cadherina-3 (CDH3). En particular, el sitio de unión del antígeno CDH3 de la molécula de unión de la invención se une específicamente al dominio EC1 de la CDH3.

“Especificidad de unión” significa que la molécula de anticuerpo tiene una afinidad de unión significativamente mayor con el antígeno diana TRAILR2 o CDH3 que con moléculas estructuralmente no relacionadas.

Cuando se hace referencia a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno u otro par de unión, decir que se une "específicamente" o "selectivamente", indica una reacción de unión que determina la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por lo tanto, en condiciones designadas, un ligando específico se une a un receptor particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra.

Un epítopo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo o un resto de unión al antígeno. El término "epítopo" incluye a cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo o unidad de unión al antígeno. En algunas formas de realización, los determinantes de epítopos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales glicano, fosforilo o sulfonilo y, en algunas formas de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión a los primeros se pierde en presencia de solventes desnaturizantes pero esto no sucede con los últimos. Tal como se los utiliza en

la presente, los términos "unión" y "unión específica" se refieren a la unión del anticuerpo o la unidad de unión del antígeno a un epítopo del antígeno en un ensayo *in vitro*, preferiblemente en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Suecia) con antígeno de tipo salvaje purificado.

El anticuerpo, o la molécula de unión que se describen en la presente se unen a su antígeno con una afinidad que es por lo menos dos veces mayor, preferiblemente por lo menos diez veces mayor, de manera más preferible por lo menos 20 veces mayor y lo de manera más preferible por lo menos 100 veces mayor que la afinidad por antígenos no relacionados. En una forma de realización preferida, el anticuerpo tendrá una afinidad superior a aproximadamente 10^9 litros/mol, según se determina, por ejemplo, mediante un análisis de Scatchard (Munsen, y col. (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239).

La afinidad es la interacción entre un único sitio de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo y un único epítopo. Se expresa mediante la constante de asociación $K_A = k_{as}/k_{dis}$, o la constante de disociación $K_D = k_{dis}/k_{as}$.

Tal como se los usa en la presente, los términos "unión" o "unión específica" se refieren a la unión del anticuerpo a un epítopo del antígeno en un ensayo *in vitro*, preferiblemente en un ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR, BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia), por ejemplo, medido a la temperatura ambiente. La afinidad de la unión se define mediante los términos k_{as} (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno), k_{dis} (constante de disociación) y K_D (k_{dis}/k_{as}). La unión específica comúnmente se refiere a la formación de un complejo entre una molécula receptora y sus ligandos. En el contexto de la unión antígeno-

anticuerpo, los anticuerpos de alta afinidad normalmente se unen a sus antígenos diana con afinidades de 10^{-9} M o menos.

En un aspecto, el anticuerpo se une a los antígenos diana TRAILR2 o CDH3 con una afinidad determinada, por ejemplo mediante un análisis de resonancia de plasmón superficial (Malmqvist M., "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.", *Curr Opin Immunol.* abril de 1993; 5(2):282-6), con un valor K_D dentro del rango entre 1 pM y 100 μ M, preferiblemente entre 1 pM y 1 μ M. La afinidad de los anticuerpos también se puede medir mediante la tecnología de ensayo de exclusión cinética (KinExA) (Darling, R.J. y Brault P-A., "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions", *ASSAY and Drug Development Technologies*", 2 de diciembre de 2004, (6): 647-657).

La afinidad de unión de una molécula de anticuerpo se puede mejorar mediante un proceso conocido como maduración de la afinidad (Marks y col., 1992, *Biotechnology* 10:779-783; Barbas, y col., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813; Shier y col., 1995, *Gene* 169:147-155). Por lo tanto, los anticuerpos madurados por afinidad también se incluyen en la presente invención.

En una forma de realización, la molécula de unión biespecífica de la presente invención puede inducir la apoptosis mediada por TRAILR2 en uno o más tipos de células cancerosas, por ejemplo en la línea celular de adenocarcinoma de colon GP2d o en la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H358, con más del 50 % de inhibición del crecimiento celular a una concentración 1 nM o menor, e incluso de manera más preferible menor de 0,01 nM.

En una forma de realización adicional, la molécula de unión de la presente

invención no puede inducir la apoptosis mediada por TRAILR2 en células negativas para CDH3, con menos del 50 % de inhibición del crecimiento celular en una concentración de hasta 1 nM, o de manera más preferible hasta 10 nM, e incluso de manera más preferible hasta 100 nM.

Los residuos de aminoácidos se indicarán de acuerdo con el código estándar de aminoácidos de tres letras o de una letra, como es conocido en general y según el acuerdo en la técnica. Cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos, el término "diferencia de aminoácidos" se refiere a inserciones, eliminaciones o sustituciones del número indicado de residuos de aminoácidos en una posición de la secuencia de referencia, en comparación con una segunda secuencia. En caso de sustitución(es), dicha(s) sustitución(es) será(n) preferiblemente sustitución(es) de aminoácido(s) conservativa(s), lo que significa que un residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido con una estructura química similar y que tiene poca o esencialmente ninguna influencia sobre la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Estas sustituciones de aminoácidos conservativas son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, de WO 98/49185, donde las sustituciones de aminoácidos conservativas son preferiblemente sustituciones en las que un aminoácido dentro de los siguientes grupos (i) - (v) se sustituye por otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo: (i) pequeños residuos alifáticos, apolares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (ii) residuos polares cargados negativamente y sus amidas (no cargadas): Asp, Asn, Glu y Gln; (iii) residuos polares cargados positivamente: His, Arg y Lys; (iv) residuos no polares alifáticos grandes: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y (v) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp. Las sustituciones de aminoácidos conservativas particularmente preferidas son las

siguientes:

Ala por Gly o por Ser;
Arg por Lys;
Asn por Gln o por His;
Asp por Glu;
Cys por Ser;
Gln por Asn;
Glu por Asp;
Gly por Ala o por Pro;
His por Asn o por Gln;
Ile por Leu o por Val;
Leu por Ile o por Val;
Lys por Arg, por Gln o por Glu;
Met por Leu, por Tyr o por Ile;
Phe por Met, por Leu o por Tyr;
Ser por Thr;
Thr por Ser;
Trp por Tyr;
Tyr por Trp o por Phe;
Val por Ile o por Leu.

Tal como se lo usa en la presente, el término "aislado" se refiere a material que se extrae de su ambiente original o nativo (por ejemplo, el ambiente natural si se produce de forma natural). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no se aísla, pero la misma molécula de ácido nucleico o polipéptido, separada por intervención

humana de algunos o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, se ha aislado. Dichas moléculas de ácido nucleico podrían ser parte de un vector y/o dichas moléculas de ácido nucleico o polipéptidos podrían ser parte de una composición, y aun así pueden ser aisladas en el sentido de que dicho vector o composición deje de formar parte del ambiente en el que se encuentra en la naturaleza la molécula de ácido nucleico o el polipéptido. Por ejemplo, se considera que una molécula de ácido nucleico o polipéptido es (está) "(en) (en forma) esencialmente aislada" cuando, en comparación con su fuente biológica nativa y/o el medio de reacción o medio de cultivo del que se ha obtenido, ha sido separada de por lo menos otro componente con el que habitualmente está asociada en dicha fuente o medio, tal como otra molécula de ácido nucleico, otro polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o por lo menos un contaminante, impureza o componente minoritario. En particular, una molécula de ácido nucleico o polipéptido se considera "esencialmente aislado" cuando se ha purificado por lo menos 2 veces, en particular por lo menos 10 veces, más en particular por lo menos 100 veces y hasta 1000 veces o más. Una molécula de ácido nucleico o polipéptido que está "en forma esencialmente aislada" preferiblemente es esencialmente homogénea, según se determina usando una técnica adecuada, tal como una técnica cromatográfica adecuada, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida. Preferentemente, las moléculas de unión y los ácidos nucleicos de la presente invención son aislados.

A no ser que se indique otra cosa, el término "secuencia" tal como se usa lo en la presente (por ejemplo, en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de molécula de unión" o "secuencia de polipéptido"), en general se debe entender que incluye tanto a la secuencia de

aminoácidos relevante como a las secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos que la codifican, a no ser que el contexto requiera una interpretación más limitada.

Tal como se los usa en la presente, los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una máxima correspondencia. Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean para fines de una óptima comparación (por ejemplo, se pueden introducir brechas en la secuencia de un primer aminoácido o secuencia de ácido nucleico para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácido o ácido nucleico). A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas) x 100). En algunas formas de realización, las dos secuencias que se comparan tienen la misma longitud después de que se introducen brechas dentro de las secuencias, según corresponda (por ejemplo, excluyendo la secuencia adicional que se extiende más allá de las secuencias que se comparan). Por ejemplo, cuando se comparan secuencias de región

variable, no se toman en consideración las secuencias directrices y/o de dominio constante. Para comparaciones de secuencias entre dos secuencias, una CDR "correspondiente" se refiere a una CDR en la misma ubicación en ambas secuencias (por ejemplo, CDR-H1 de cada secuencia).

La determinación del porcentaje de identidad o el porcentaje de similitud entre dos secuencias se puede realizar usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos en BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas en BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una proteína de interés. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul y col., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Como alternativa, para realizar una búsqueda iterativa que detecta relaciones distantes entre moléculas se puede usar PSI-Blast (Id). Al utilizar los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo preferido, no limitativo, de un algoritmo matemático que se utiliza para la comparación de secuencias es el algoritmo de

Myers y Miller, CABIOS (1989). Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de residuos de peso PAM120, una restricción de longitud de falta de coincidencia de 12 y una restricción por falta de coincidencia de 4. En la técnica se conocen algoritmos adicionales para el análisis de secuencias, los cuales incluyen ADVANCE y ADAM que se describen en Torellis y Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; y FASTA que se describe en Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y velocidad de la búsqueda. Si ktup= 2, se encuentran las regiones similares en las dos secuencias que se comparan observando pares de residuos alineados; si ktup= 1, se examinan aminoácidos alineados individuales. ktup se puede establecer en 2 o 1 para secuencias de proteínas, o entre 1 y 6 para secuencias de ADN. Si no se especifica, el valor predeterminado de ktup es 2 para proteínas y 6 para ADN. Como alternativa, el alineamiento de secuencias de proteínas se puede llevar a cabo usando el algoritmo CLUSTAL W, según han descrito Higgins y col., 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402. Preferiblemente, se usa el algoritmo CLUSTAL W descrito anteriormente.

Tal como se lo usa en la presente, el término "que comprende", indica que además de los componentes y/o pasos mencionados específicamente se pueden incluir componentes y/o pasos adicionales. Sin embargo, este término también abarca que el objeto que se reivindica consiste exactamente en los componentes y/o pasos mencionados.

Tal como se lo usa en la presente, el término "por lo menos" se refiere a

cualquier número que incluya el número mencionado específicamente y cualquier número superior al mismo. Por ejemplo, "por lo menos uno" abarca a exactamente uno, así como a más de uno, incluyendo sin limitación a dos, por ejemplo tres o cuatro. Además se incluye, por ejemplo cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, como 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 o 500, así como cualquier número entero entre estos dichos números que se han mencionado específicamente o sobre los mismos. Con respecto al término "por lo menos un sitio de unión al antígeno", se prefiere particularmente que dicho término abarque a uno, dos, tres o cuatro sitios de unión al antígeno. De manera más preferible, dicho término se refiere exactamente a un sitio de unión al antígeno. En aquellos casos en los que se selecciona más de un sitio de unión al antígeno para una diana, estos múltiples sitios de unión al antígeno se pueden elegir de manera independiente, es decir, pueden ser idénticos o pueden diferir entre sí.

Tal como se lo usa en la presente, el término "polipéptido" describe cadenas moleculares lineales de aminoácidos, incluyendo a los polipéptidos de la cadena simple o sus fragmentos, que contienen más de 30 aminoácidos. Por otro lado, tal como se lo usa en la presente invención, el término "péptido" describe cadenas lineales de aminoácidos que contienen hasta 30 aminoácidos. Tal como se lo utiliza de acuerdo con la presente invención, el término "(poli)péptido" se refiere a un grupo de moléculas que comprende al grupo de los péptidos, que consisten en hasta 30 aminoácidos, así como al grupo de los polipéptidos, que consisten en más de 30 aminoácidos.

Tal como se lo usa en la presente, el término "conector" abarca tanto a los conectores peptídicos, es decir, secuencias de aminoácidos, como a los conectores no peptídicos, que conectan covalente o no covalentemente partes

individuales de una molécula. Tal como se lo usa en la presente, el término "conector no peptídico" se refiere a grupos de enlace que tienen dos o más grupos reactivos pero que excluyen a los conectores peptídicos según se define más adelante. Por ejemplo, el conector no peptídico puede ser un polímero que tenga grupos reactivos en ambos extremos, que se unen individualmente a los grupos reactivos de las partes de unión de la molécula de la invención, por ejemplo, un extremo amino, un residuo lisina, un residuo histidina o un residuo cisteína. Los grupos reactivos del polímero incluyen un grupo aldehído, un grupo aldehído propiónico, un grupo butil aldehído, un grupo maleimida, un grupo cetona, un grupo vinilsulfona, un grupo tiol, un grupo hidrazida, un grupo carbonildiimidazol (CDI), un grupo carbonato de nitrofenilo (NPC), un grupo trisilato, un grupo isocianato y derivados succinimida. Algunos ejemplos de derivados succinimida incluyen propionato de succinimidilo (SPA), ácido succinimidilo butanoico (SBA), carboximetilato de succinimidilo (SCM), succinimidil succinamida (SSA), succinato de succinimidilo (SS), carbonato de succinimidilo y N-hidroxisuccinimida (NHS). Los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, el polímero no peptídico puede tener un grupo maleimida en un extremo y un grupo aldehído en el otro extremo.

Los conectores peptídicos, tal como se los contempla en la presente, son conectores (poli)peptídicos de por lo menos 1 aminoácido de longitud. Preferiblemente, los conectores tienen una longitud de entre 1 y 100 aminoácidos. De manera más preferible, los conectores tienen una longitud de entre 5 y 50 aminoácidos, de manera más preferible una longitud de entre 10 y 40 aminoácidos, e incluso de manera más preferible, los conectores tienen una

longitud de entre 15 y 30 aminoácidos. Algunos ejemplos no limitativos de conectores pequeños que se utilizan con frecuencia incluyen secuencias de aminoácidos glicina y serina, que se denominan miniconectores GS. Algunos ejemplos preferidos de secuencias conectoras son conectores Gly/Ser de diferentes longitudes, como los conectores $(\text{gly}_x\text{ser}_y)_z$, incluyendo a $(\text{gly}_4\text{ser})_3$, $(\text{gly}_4\text{ser})_4$, (gly_4ser) , (gly_3ser) , gly_3 , y $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_3$. La cantidad de aminoácidos de estos conectores puede variar, por ejemplo, pueden ser 4 (por ejemplo, GGGS) (SEQ ID NO: 95), 6 (por ejemplo, GGS GGS) (SEQ ID NO: 94), 7 (por ejemplo, GGS GGS) (SEQ ID NO: 221)), o múltiplos de dichos números, como por ejemplo dos o tres o más repeticiones de estos cuatro/seis aminoácidos. De manera más preferible, dichos miniconectores GS tienen 20 aminoácidos y la secuencia GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 232). Otros ejemplos de conectores incluyen a los siguientes:

Conector	Secuencia	SEQ ID NO
Conector 5GS:	GGGS	222
Conector 7GS:	SGSGGS	223
Conector 8GS:	GGGCGGS	224
Conector 9GS:	GGGSGGS	225
Conector 10GS:	GGGSGGGGS	226
Conector 15GS:	GGGSGGGSGGGGS	227
Conector 18GS:	GGGSGGGSGGGGGGS	228
Conector 20GS:	GGGSGGGSGGGSGGGGS	232
Conector 25GS:	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	229
Conector 30GS:	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	230
Conector 35GS:	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS GGGS	231

Los especialistas en la materia podrán apreciar que cuando la molécula de interés es una sola cadena polipeptídica, el conector es un conector peptídico.

Se sabe en la técnica que la naturaleza, es decir, la longitud y/o las composiciones, como por ejemplo la secuencia de aminoácidos del conector, puede modificar o potenciar la estabilidad y/o solubilidad de la molécula que contiene el conector. Normalmente, la longitud y la secuencia de un conector se seleccionan dependiendo de la composición de la respectiva molécula de interés. Los especialistas en la materia conocen bien los métodos para diseñar y probar la idoneidad de diferentes conectores, véase, por ejemplo, Volkel, T. y col. *Protein Engineering, Design and Selection*, volumen 14, número 10, 2001, páginas 815–823. Por ejemplo, las propiedades de la molécula se pueden analizar fácilmente mediante la comparación de la afinidad de unión de las partes de unión de la molécula de la invención. En el caso de la molécula trispecífica de la invención, las mediciones respectivas para cada parte de unión se pueden realizar por separado. La estabilidad de la molécula que se obtiene como resultado se puede medir utilizando un método basado en ELISA para determinar la capacidad de unión residual de la molécula después de la incubación en suero humano a 37°C durante diversos períodos de tiempo. Otras pruebas adecuadas se pueden encontrar, por ejemplo, en Brian R. Miller, B.R. y col. *Protein Engineering, Design and Selection*, volumen 23, número 7, 2010, páginas 549–557 o Kügler, M. y col. *Protein Engineering, Design and Selection*, volumen 22, número 3, 2009, páginas 135–147.

De acuerdo con la presente invención, el término "molécula de ácido nucleico", que en la presente se usa como sinónimo del término "polinucleótido", incluye al ADN, por ejemplo ADNc o ADN genómico, y al ARN, por ejemplo

ARNm. Además incluyen a las moléculas que imitan a los ácidos nucleicos conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, derivados sintéticos o semisintéticos de ADN o ARN y polímeros mixtos. Dichas moléculas que imitan ácidos nucleicos o derivados de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención incluyen fosforotioato-ácido nucleico, fosforamidato-ácido nucleico, 2'-O-metoxietilo-ácido ribonucleico, morfolino-ácido nucleico, hexitol-ácido nucleico (HNA) y ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Los LNA son un derivado de ARN donde el anillo ribosa está restringido por una conexión mediante metileno entre el oxígeno 2' y el carbono 4'. Como podrán apreciar fácilmente los especialistas en la materia, los mismos pueden contener bases de nucleótidos adicionales no naturales o derivadas.

Moléculas de unión de la invención

En un primer aspecto, la invención provee una molécula de unión que comprende por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica al receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2) y por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a cadherina-3 (CDH3). Preferiblemente, dicho por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une a CDH3, se une de manera específica al dominio EC1 de CDH3.

Por lo tanto, la molécula de unión de la invención (también llamada en la presente la “proteína de la invención” o el “unidor de la invención”) comprende por lo menos los dos sitios diferentes de unión al antígeno mencionados de manera específica, es decir por lo menos un sitio de unión a TRAILR2 y por lo menos un sitio de unión a CDH3. Debido a las al menos dos especificidades, la

molécula de unión de la invención también es llamada en la presente “molécula de unión biespecífica” de la invención.

El término CDH3, como se usa en la presente, se refiere a “cadherina-3”, también conocida como “P-cadherina”. La CDH3, un miembro de la superfamilia similares a cadherina es una glicoproteína de adhesión célula a célula dependiente de calcio compuesta por cinco repeticiones extracelulares de cadherina (EC), una región transmembrana y una cola citoplasmática muy conservada. La CDH3 de humano está representada por la SEQ ID NO:98 así como en el número de acceso a la base de datos UniProt P22223, disponible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P22223>.

Las cadherinas son un grupo de proteínas transmembrana que sirven como las principales moléculas de adhesión localizadas en las uniones adherentes. Estas pueden regular la adhesión célula a célula a través de su dominio extracelular y sus dominios citosólicos se conectan al citoesqueleto de actina por unión a las cateninas. Estructuralmente, las cadherinas comprenden varios dominios: clásicamente, estos incluyen una secuencia señal; un propéptido de alrededor de 130 residuos; un dominio transmembrana individual y cinco dominios cadherina extracelulares repetidos en tándem, 4 de los cuales son repeticiones de cadherina, y el quinto típicamente contiene 4 cisteínas conservadas y un dominio citoplasmático de extremo C terminal. Sin embargo, las proteínas se designan como miembros de la familia de cadherina ampliamente definida si tienen una o más repeticiones de cadherina. Una repetición de cadherina es una secuencia con plegamiento independiente de aproximadamente 110 aminoácidos que típicamente contiene motivos con las secuencias conservadas DRE, DXNDNAPXF, y DXD.

Como se usa en la presente, el término “dominio EC1 de CDH3” se refiere a la primera de las repeticiones extracelulares de cadherina de CDH3. De manera específica, el dominio EC1 de CDH3 se representa con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:99.

En consecuencia, el término “dominio EC2 de CDH3” se refiere a la segunda repetición extracelular de cadherina de CDH3, representada por SEQ ID NO:100.

La molécula de unión de la presente invención no se limita de manera particular respecto a su formato, con la condición de que comprenda por lo menos los dos sitios de unión al antígeno diferentes (TRAILR2 y CDH3) indicados de manera específica y que tenga la capacidad de unirse a estas dos dianas. Como tal, el formato puede estar basado en el formato de un anticuerpo de origen natural o de un derivado de anticuerpo, o fragmentos de dichos anticuerpos, así como miméticos de anticuerpo. Dichos formatos se pueden modificar según se requiera para acomodar los tres sitios de unión al antígeno, por ejemplo, para comprender de manera adicional un fragmento de anticuerpo adicional, en particular un fragmento Fv, Fab, Fab', o F(ab')₂, un anticuerpo de cadena única, en particular un fragmento variable de cadena única (scFv), un inmunofármaco Modular Pequeño (SMIP, *del inglés Small Modular Immunopharmaceutical*), un anticuerpo dominio, o un nanobody. Otros ejemplos no limitantes de formatos adecuados que se pueden emplear, de manera individual o para todos los sitios de unión al antígeno, incluyen los miméticos de anticuerpo definidos precedentemente en la presente.

En una forma de realización preferida, el por lo menos un sitio de unión al antígeno de la molécula de unión descrito en la presente que se une de manera

específica a cadherina-3 (CDH3) es una molécula de inmunoglobulina (Ig) (que tiene la estructura con forma de Y convencional de un anticuerpo de longitud completa que comprende dos cadenas pesadas y dos livianas) y el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica al receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2) comprende uno o más elementos de unión scFv, scFab, Fab o Fv. Preferiblemente el sitio de unión al antígeno que se une de manera específica al receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2) comprende uno o más scFv. Incluso más preferiblemente, la molécula de unión que se describe en la presente comprende dos sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a TRAILR2, en donde cada uno comprende un scFv, es decir dicha molécula de unión comprende dos scFv con especificidad por diana de TRAILR2.

Un "fragmento Fv de cadena única" (scFv) es un polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un conector, y un dominio variable de cadena liviana (VL) de anticuerpo, en donde dichos dominios de anticuerpo y dicho conector tienen uno de los siguientes órdenes en la dirección desde el extremo N a C terminal: a) VH--conector-VL, b) VL-conector-VH, y en donde dicho conector es un polipéptido de entre 15 y 25 aminoácidos, preferiblemente 20 aminoácidos, de longitud.

Además, estos fragmentos Fv de cadena única pueden ser estabilizados de manera adicional a través de la incorporación de enlaces disulfuro entre los dominios VH y VL, en el dominio VH, o en el dominio VL, mediante la incorporación de residuos de cisteína. El término extremo N terminal se refiere al primer aminoácido de la cadena polipeptídica mientras que el término extremo C terminal se refiere al último aminoácido del extremo C terminal de la cadena

polipeptídica. Por lo tanto una forma de realización de la invención es aquella en donde el uno o más scFv comprenden residuos de cisteína adicionales para formar enlaces disulfuro.

En una forma de realización de la invención, la estabilidad de la unidad scFv se puede aumentar a través de la incorporación de dos residuos de cisteína en proximidad en 3 dimensiones para formar un enlace disulfuro en el scFv (referido en la presente como scFvss). Cuando el scFv deriva de las secuencias de la región V de TRv1 (tal como se describe precedentemente), los sitios potenciales ejemplificativos en donde se pueden modificar dichos enlaces disulfuro estabilizantes incluyen: (a) entre la posición 99 de VL y la posición 45 de VH, (b) entre la posición 102 de VL y la posición 44 de VH, (c) entre las posiciones 4 y 100 de VL, y (d) entre las posiciones 6 y 112 de VH. Para lograr la estabilización mediante los enlaces disulfuro diseñados, los residuos en estas posiciones preferiblemente se sustituyen por residuos de cisteína.

Preferiblemente, dicho sitio de unión al antígeno anti-TRAILR2 es un scFv que está fusionado al extremo C terminal de la cadena pesada de la molécula de inmunoglobulina; por ejemplo, un scFv que está fusionado a una de las cadenas pesadas de la molécula de Ig, o dos scFv, en donde un scFv está fusionado a una de las dos cadenas pesadas y otro scFv está fusionado a la otra cadena pesada. De esta manera, se forma una cadena pesada modificada.

En una forma de realización preferida, las moléculas biespecíficas de unión de la invención comprenden moléculas de inmunoglobulina modificadas en donde (i) la cadena pesada de la inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada que se une de manera específica a CDH3, dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina

y también un scFv, que se une de manera específica a TRAILR2, que comprende una secuencia de aminoácidos de dominios variables de cadena liviana y de cadena pesada, y en donde el scFv está unido al extremo C terminal de los dominios constantes de la Ig, y (ii) la cadena liviana de la inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena liviana que se une de manera específica al CDH3 y un dominio constante de cadena liviana. Preferiblemente, las moléculas de inmunoglobulina modificadas comprenden dos cadenas pesadas de inmunoglobulina (por ejemplo, cadena pesada modificada) y dos cadenas livianas de inmunoglobulina.

La fusión de los diversos componentes entre sí es bien conocida en el arte. Dicha fusión, por ejemplo, puede ser a través de conectores peptídicos o a través de conectores no peptídicos. Preferiblemente, dicha fusión es a través de uno o más conectores peptídicos.

En un aspecto específico de la invención, el uno o más scFv que se unen de manera específica a TRAILR2 se fusionan a la molécula de Ig que se une de manera específica CDH3 mediante un conector peptídico, preferiblemente un conector peptídico que tiene una longitud de entre aproximadamente 4 y 20 aminoácidos (por ejemplo, cualquier valor entre 6, 9, 12, o 15). Preferiblemente el scFv está fusionado al extremo C terminal de la cadena pesada de la molécula de Ig.

Los métodos para conectar las moléculas de scFv al extremo C terminal de la cadena pesada de la molécula de IgG o conectar los dominios variables dentro de las moléculas de scFv son bien conocidos en el arte. Típicamente se usa una secuencia conectora pequeña de aminoácidos glicina y serina (también llamado miniconector GS).

El número de aminoácidos en el conector puede variar entre 4 a 10 o más, como se describe en la presente. En la práctica, normalmente el conector se forma por la combinación de la molécula de ácido nucleico que codifica para la IgG de interés (que en este caso incluiría al ácido nucleico que codifica para el dominio variable de la cadena pesada para el sitio de unión a CDH3 y los dominios constantes del tipo de IgG) con el ácido nucleico que codifica para el scFv deseado (que en este caso incluiría al ácido nucleico que codifica para el dominio variable de las cadenas pesada y liviana, ya sea en orientación VL-VH o bien en orientación VH-VL para el sitio de unión a TRAILR2) separados por la molécula de ácido nucleico que codifica para la secuencia conectora (por ejemplo, un miniconector GS con un número de 5, 10, 15, o 20 aminoácidos, preferiblemente un conector tal como GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:232)). Luego, como se explica más adelante, esta cadena pesada modificada completa que codifica para la molécula de ácido nucleico se coloca dentro de un vector de expresión y se introduce en células huésped apropiadas de manera de formar el polipéptido completo cadena pesada de IgG-scFv individual.

Preferiblemente el conector entre la molécula de scFv y el extremo C terminal de la cadena pesada de la molécula de IgG es GGSGGS (SEQ ID NO:94) o GGGSGGS.

Preferiblemente, dicha molécula de inmunoglobulina es una molécula de inmunoglobulina monoclonal, quimérica, humanizada o humana (por ejemplo, un anticuerpo). Se prefiere más que la región constante de cadena pesada de dicha molécula de inmunoglobulina se seleccione del grupo que consiste en las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE. En otra forma de

realización preferida, la región constante de cadena liviana de dicha molécula de inmunoglobulina es kappa o lambda. Preferiblemente, la molécula de Ig es una IgG.

En una forma de realización, la presente invención provee una molécula de unión que es una proteína de unión multiespecífica que comprende (i) una molécula de Ig que se une de manera específica CDH3 con dos cadenas pesadas y dos livianas, y (ii) dos moléculas de scFv (scFv(s)) en donde cada una se une de manera específica a TRAILR2. Preferiblemente, cada cadena pesada de la molécula de Ig tiene un scFv fusionado a su extremo C terminal, formando de esta manera un proteína de unión biespecífica tetravalente.

En una forma de realización, la presente invención provee una molécula de unión (también llamada en la presente proteína de unión multiespecífica o molécula de Ig modificada) con:

(i) dos cadenas pesadas (por ejemplo, cadena pesada modificada), en donde cada una comprende desde el extremo N al extremo C:

- un dominio variable de cadena pesada específico para CDH3 (por ejemplo, dominio VH murino, humanizado o humano), preferiblemente, específico para el dominio EC1 de CDH3,

- dominios constantes de una IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG4 humana),

- un conector peptídico (por ejemplo, un miniconector GS), y

- un scFv específico de TRAILR2 (por ejemplo, un scFv que comprende desde el extremo N al extremo C un dominio VH (por ejemplo, dominio VH murino, humanizado o humano) un conector y un dominio VL (por ejemplo, dominio VL murino, humanizado o humano), o viceversa, un dominio VL un conector y un dominio VH); y

(ii) dos cadenas livianas, en donde cada una comprende desde el extremo N al extremo C terminal:

- un dominio variable de cadena liviana específica para CDH3 (por ejemplo, dominio VL murino, humanizado o humano), preferiblemente, específico para el dominio EC1 de CDH3,

- un dominio constante de cadena liviana (por ejemplo, una cadena kappa humana).

Debido a que la región Fc de un anticuerpo interacciona con varios receptores Fc, lo que da como resultado varias capacidades funcionales importantes (que se denominan “funciones efectoras”), el anticuerpo es, en determinadas formas de realización, un anticuerpo de longitud completa o un anticuerpo que contiene una parte de la región Fc, esto último siempre que el anticuerpo presente unión específica tanto para la parte relevante del antígeno como para los receptores Fc y los complementos. La elección del tipo y la longitud de la región constante depende de si las funciones efectoras como la fijación del complemento o la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos sean características deseables, y de las propiedades farmacológicas deseadas de la proteína del anticuerpo.

En una forma de realización de la invención, la molécula de unión de la invención puede tener una región Fc, o la sección relevante de la misma, que se ha modificado por ingeniería para evitar un entrecruzamiento no deseado con los receptores Fc gamma solubles o con el componente del complemento C1q. En una forma de realización, dicha molécula de unión o variante de anticuerpo tiene afinidades mucho menores para los receptores Fc gamma y el componente del complemento C1q que el anticuerpo parental. (En lo sucesivo, si no se afirma lo

contrario, el término “parental” en el contexto de una molécula de anticuerpo, o en el contexto de una IgG o la región Fc, se refiere a la molécula de anticuerpo, región Fc o IgG no modificadas por ingeniería, respectivamente, a partir de las que se obtiene la molécula mutada (modificada por ingeniería)). Por lo tanto, una forma de realización de la invención es aquella en donde la molécula de la Ig comprende una Fc variante que tiene una afinidad reducida por los receptores Fc gamma o los receptores del complemento, o ambos, en comparación con una región Fc de tipo salvaje. Dicha molécula de Ig se denomina en la presente IgG1(KO).

Otra forma de realización de la invención es aquella en donde la molécula de unión de la invención comprende una región Fc, o la sección relevante de la misma, que se ha modificado por ingeniería para modificar los niveles séricos (vida media) mediante la optimización de su interacción con el receptor Fc neonatal (FcRn), por ejemplo, mediante una mutación puntual en el dominio CH2 en la posición H310A. Dicha molécula de Ig se denomina en la presente IgG1FcRnmut.

Otra forma de realización de la invención es aquella en donde la molécula de unión comprende una molécula de Ig que comprende una región bisagra variante de IgG4 que anula el intercambio de la cadena pesada con otras moléculas de IgG4. Dicha molécula de Ig se denomina en la presente IgG4Pro.

La presente invención provee una molécula de unión biespecífica que tiene por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica al receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2) y por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a cadherina-3 (CDH3).

Los métodos para preparar los sitios de unión que se unen a los antígenos diana específicos son bien conocidos en el arte. El experto en la materia puede usar fácilmente estos métodos para idear un sitio de unión al antígeno que tenga la especificidad necesaria para los antígenos diana TRAILR2 o CDH3.

Los métodos para generar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden generar a través de uno cualquiera de los varios métodos que emplean la inducción de la producción *in vivo* de moléculas de anticuerpo, mediante selección de bibliotecas de inmunoglobulina (Orlandi y col, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837; Winter y col 1991, Nature 349:293-299) o mediante la generación de moléculas de anticuerpos monoclonales mediante líneas celulares en cultivo. Estas incluyen, a título enunciativo no taxativo, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de células B humanas y la técnica del hibridoma de virus Epstein-Barr (EBV) (Kohler y col 1975. Nature 20 256:4950497; Kozbor y col 1985. J. Immunol. Methods 81 :31 -42; Cote y col 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole y col 1984. Mol. Cell. Biol. 62:109-120).

En algunas formas de realización, el sitio de unión al antígeno (para CDH3 y/o TrailR2) es un sitio de unión al antígeno “humanizado” (por ejemplo, que comprende un dominio VH/VL humanizado) que comprende residuos de aminoácido de regiones hipervariables no humanas (HVR; por ejemplo, regiones determinantes de complementariedad (CDR)) y residuos de aminoácido de secuencias de marcos de lectura humanos. En algunas formas de realización, el sitio de unión al antígeno (específico para CDH3 y/o TRAILR2) es un sitio de unión al antígeno humano (por ejemplo, que comprende un dominio VH/VL

humano) que comprende secuencias de CDR y FR que derivan de secuencias del genoma humano.

Las secuencias de aminoácidos de los sitios de unión al antígeno específicos se proveen en la descripción y en el listado de secuencias.

A continuación se proveen detalles de las formas de realización preferidas de la invención que comprenden sitios de unión al antígeno específicos para TRAILR2 y/o CDH3.

En una forma de realización preferida, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:3 (CDR1), SEQ ID NO:4 (CDR2) y SEQ ID NO:5 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3).

En otra forma de realización preferida, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:17 (CDR1), SEQ ID NO:18 (CDR2) y SEQ ID NO:19 (CDR3).

En otra forma de realización preferida, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:23 (CDR1), SEQ ID NO:24 (CDR2) y SEQ ID NO:25 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:27 (CDR1), SEQ ID NO:28 (CDR2) y SEQ ID NO:29 (CDR3).

En otra forma de realización preferida, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:33 (CDR1), SEQ ID NO:34 (CDR2) y SEQ ID NO:35 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) y SEQ ID NO:39 (CDR3).

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la invención, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a TRAILR2 comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:73 (CDR1), SEQ ID NO:74 (CDR2) y SEQ ID NO:75 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:77 (CDR1), SEQ ID NO:78 (CDR2) y SEQ ID NO:79 (CDR3).

Por lo tanto, en un aspecto específico, la molécula de unión que se describe en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3, que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:3 (HCDR1), SEQ ID NO:4 (HCDR2) y SEQ ID NO:5 (HCDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:7 (LCDR1), SEQ ID NO:8 (LCDR2) y SEQ ID NO:9 (LCDR3); y por lo menos uno, preferiblemente dos, sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a TRAILR2 que comprenden las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:73 (HCDR1), SEQ ID NO:74 (HCDR2) y SEQ ID NO:75 (HCDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las

secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:77 (LCDR1), SEQ ID NO:78 (LCDR2) y SEQ ID NO:79 (LCDR3).

En otro aspecto específico, la molécula de unión que se describe en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3, que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:13 (HCDR1), SEQ ID NO:14 (HCDR2) y SEQ ID NO:15 (HCDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:17 (LCDR1), SEQ ID NO:18 (LCDR2) y SEQ ID NO:19 (LCDR3); y por lo menos uno, preferiblemente dos, sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a TRAILR2 que comprenden las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:73 (HCDR1), SEQ ID NO:74 (HCDR2) y SEQ ID NO:75 (HCDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:77 (LCDR1), SEQ ID NO:78 (LCDR2) y SEQ ID NO:79 (LCDR3).

En otro aspecto específico, la molécula de unión que se describe en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3, que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:23 (HCDR1), SEQ ID NO:24 (HCDR2) y SEQ ID NO:25 (HCDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:27 (LCDR1), SEQ ID NO:28 (LCDR2) y SEQ ID NO:29 (LCDR3); y por lo menos uno, preferiblemente dos, sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a TRAILR2 que comprenden las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:73 (HCDR1),

SEQ ID NO:74 (HCDR2) y SEQ ID NO:75 (HCDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:77 (LCDR1), SEQ ID NO:78 (LCDR2) y SEQ ID NO:79 (LCDR3).

En aún otro aspecto específico, la molécula de unión que se describe en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3, que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:33 (HCDR1), SEQ ID NO:34 (HCDR2) y SEQ ID NO:35 (HCDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:37 (LCDR1), SEQ ID NO:38 (LCDR2) y SEQ ID NO:39 (LCDR3); y por lo menos uno, preferiblemente dos, sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a TRAILR2 que comprenden las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:73 (HCDR1), SEQ ID NO:74 (HCDR2) y SEQ ID NO:75 (HCDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:77 (LCDR1), SEQ ID NO:78 (LCDR2) y SEQ ID NO:79 (LCDR3).

Las CDR que se describen en la presente y las que se describieron en las SEQ ID Nos anteriormente se presentan de acuerdo con la nomenclatura de Kabat y se muestran en la Tabla 1 a continuación. Como se usa en la presente, HCDR se refiere a la CDR de la cadena pesada y LCDR a la CDR de la cadena liviana.

Como se conocen nomenclaturas adicionales en el arte, en la Tabla 1 a continuación se muestran las secuencias de las CDR basadas en la su nomenclatura más utilizada. Estas numeraciones se basan en

- (i) CCG (Chemical Computing Group como se ilustra en Almagro y col., Proteins 2011; 79:3050-3066 y Maier y col, Proteins 2014; 82:1599-1610),
- (ii) Chothia (Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917),
- (iii) IMGT (Lefranc MP, Dev Comp Immunol. 2003 Jan;27(1):55-77)
- and
- (iv) North (North B, J Mol Biol. (2011) 406:228–56).

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos y SEQ ID NO de las CDR comprendidas en las moléculas de unión de la invención:			
Número de SEQ ID	Descripción de la secuencia	Nomenclatura	Secuencia
3	CDH3v7 HCDR1	Kabat	SYYWS
101		Chothia	GGSISSY
102		IMGT	GGSISSYY
103		CCG	GGSISSYYWS
104		North	TVSGGSISSYYWS
4	CDH3v7 HCDR2	Kabat	YIYYSRTTNYNPSLKS
105		Chothia	YYSRT
106		IMGT	IYYSRTT
107		CCG	YIYYSRTTNYNPSLKS
108		North	YIYYSRTTN
5	CDH3v7 HCDR3	Kabat	ARNGIDAFDI
109		Chothia	ARNGIDAFDI
110		IMGT	ARARNGIDAFDI

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos y SEQ ID NO de las CDR comprendidas en las moléculas de unión de la invención:			
Número de SEQ ID	Descripción de la secuencia	Nomenclatura	Secuencia
111		CCG	ARNGIDAFDI
112		North	ARARNGIDAFDI
7	CDH3v7 LCDR1	Kabat	RSSQSLLHSYGYNYLD
113		Chothia	RSSQSLLHSYGYNYLD
114		IMGT	QSLLHSYGYNY
115		CCG	RSSQSLLHSYGYNYLD
116		North	RSSQSLLHSYGYNYLD
8	CDH3v7 LCDR2	Kabat	LGSNRAS
117		Chothia	LGSNRAS
118		IMGT	LGS
119		CCG	LGSNRAS
120		North	YLGSNRAS
9	CDH3v7 LCDR3	Kabat	MQALQTPLT
121		Chothia	MQALQTPLT
122		IMGT	MQALQTPLT
123		CCG	MQALQTPLT
124		North	MQALQTPLT
13	CDH3v1 HCDR1	Kabat	SYWIG
125		Chothia	GYSFTSY
126		IMGT	GYSFTSYW

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos y SEQ ID NO de las CDR comprendidas en las moléculas de unión de la invención:			
Número de SEQ ID	Descripción de la secuencia	Nomenclatura	Secuencia
127		CCG	GYSFTSYWIG
128		North	KGSGYSFTSYWIG
14	CDH3v1 HCDR2	Kabat	IIYPGDS DTRYSPSFQG
129		Chothia	YPGDSD
130		IMGT	IYPGDS DT
131		CCG	IIYPGDS DTRYSPSFQG
132		North	IIYPGDS DTR
15	CDH3v1 HCDR3	Kabat	HSFFDY
133		Chothia	HSFFDY
134		IMGT	ARHSFFDY
135		CCG	HSFFDY
136		North	ARHSFFDY
17	CDH3v1 LCDR1	Kabat	RASQSVSSIYLA
137		Chothia	RASQSVSSIYLA
138		IMGT	QSVSSIY
139		CCG	RASQSVSSIYLA
140		North	RASQSVSSIYLA
18	CDH3v1 LCDR2	Kabat	GASSRAT
141		Chothia	GASSRAT
142		IMGT	GAS

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos y SEQ ID NO de las CDR comprendidas en las moléculas de unión de la invención:			
Número de SEQ ID	Descripción de la secuencia	Nomenclatura	Secuencia
143		CCG	GASSRAT
144		North	YGASSRAT
19	CDH3v1 LCDR3	Kabat	QQYSSSPRT
145		Chothia	QQYSSSPRT
146		IMGT	QQYSSSPRT
147		CCG	QQYSSSPRT
148		North	QQYSSSPRT
23	CDH3v2 HCDR1	Kabat	NYYWS
149		Chothia	GGISISNY
150		IMGT	GGISISNYY
151		CCG	GGISISNYYWS
152		North	TVSGGISISNYYWS
24	CDH3v2 HCDR2	Kabat	YMYYSGITNYPNPSLKS
153		Chothia	YYSGI
154		IMGT	MYYSGIT
155		CCG	YMYYSGITNYPNPSLKS
156		North	YMYYSGITN
25	CDH3v2 HCDR3	Kabat	ERNGIDGMDV
157		Chothia	ERNGIDGMDV
158		IMGT	ARERNGIDGMDV

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos y SEQ ID NO de las CDR comprendidas en las moléculas de unión de la invención:			
Número de SEQ ID	Descripción de la secuencia	Nomenclatura	Secuencia
159		CCG	ERNGIDGMDV
160		North	ARERNGIDGMDV
27	CDH3v2 LCDR1	Kabat	RSSQSLLHSYGYNYLD
161		Chothia	RSSQSLLHSYGYNYLD
162		IMGT	QSLLHSYGYNY
163		CCG	RSSQSLLHSYGYNYLD
164		North	RSSQSLLHSYGYNYLD
28	CDH3v2 LCDR2	Kabat	LGSNRAS
165		Chothia	LGSNRAS
166		IMGT	LGS
167		CCG	LGSNRAS
168		North	YLGSNRAS
29	CDH3v2 LCDR3	Kabat	MQALQTPIT
169		Chothia	MQALQTPIT
170		IMGT	MQALQTPIT
171		CCG	MQALQTPIT
172		North	MQALQTPIT
33	CDH3v3 HCDR1	Kabat	GYYWS
173		Chothia	GGSIGY
174		IMGT	GGSIGYY

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos y SEQ ID NO de las CDR comprendidas en las moléculas de unión de la invención:			
Número de SEQ ID	Descripción de la secuencia	Nomenclatura	Secuencia
175		CCG	GGSIGGYYSWS
176		North	TVSGGSISGYYSWS
34	CDH3v3 HCDR2	Kabat	YIYY SANTNYPNPSLKS
177		Chothia	YYSAN
178		IMGT	IYY SANT
179		CCG	YIYY SANTNYPNPSLKS
180		North	YIYY SANTN
35	CDH3v3 HCDR3	Kabat	GGSGSYWAFDI
181		Chothia	GGSGSYWAFDI
182		IMGT	SRGGSGSYWAFDI
183		CCG	GGSGSYWAFDI
184		North	SRGGSGSYWAFDI
37	CDH3v3 LCDR1	Kabat	RSSQSLMYSYGYNLYD
185		Chothia	RSSQSLMYSYGYNLYD
186		IMGT	QSLMYSYGYNLYD
187		CCG	RSSQSLMYSYGYNLYD
188		North	RSSQSLMYSYGYNLYD
38	CDH3v3 LCDR2	Kabat	LGSNRAS
189		Chothia	LGSNRAS
190		IMGT	LGS

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos y SEQ ID NO de las CDR comprendidas en las moléculas de unión de la invención:			
Número de SEQ ID	Descripción de la secuencia	Nomenclatura	Secuencia
191		CCG	LGSNRAS
192		North	YLGSNRAS
39	CDH3v3 LCDR3	Kabat	MQALQTPPT
193		Chothia	MQALQTPPT
194		IMGT	MQALQTPPT
195		CCG	MQALQTPPT
196		North	MQALQTPPT
73	TRAILR2 HCDR1	Kabat	DYGMS
197		Chothia	GFTFDDY
198		IMGT	GFTFDDYG
199		CCG	GFTFDDYGMS
200		North	AASGFTFDDYGMS
74	TRAILR2 HCDR2	Kabat	GINWNGGSTGYADSVKG
201		Chothia	NWNGGS
202		IMGT	INWNGGST
203		CCG	GINWNGGSTGYADSVKG
204		North	GINWNGGSTG
75	TRAILR2 HCDR3	Kabat	ILGAGRGWYFDL
205		Chothia	ILGAGRGWYFDL
206		IMGT	AKILGAGRGWYFDL

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos y SEQ ID NO de las CDR comprendidas en las moléculas de unión de la invención:			
Número de SEQ ID	Descripción de la secuencia	Nomenclatura	Secuencia
207		CCG	ILGAGRGWYFDL
208		North	AKILGAGRGWYFDL
77	TRAILR2 LCDR1	Kabat	QGDSLRSYYAS
209		Chothia	QGDSLRSYYAS
210		IMGT	SLRSYY
211		CCG	QGDSLRSYYAS
212		North	QGDSLRSYYAS
78	TRAILR2 LCDR2	Kabat	GKNNRPS
213		Chothia	GKNNRPS
214		IMGT	GKN
215		CCG	GKNNRPS
216		North	YGKNNRPS
79	TRAILR2 LCDR3	Kabat	NSRDSSGNHVV
217		Chothia	NSRDSSGNHVV
218		IMGT	NSRDSSGNHVV
219		CCG	NSRDSSGNHVV
220		North	NSRDSSGNHVV

Las posiciones de aminoácidos indicadas para las CDR en la presente (véase la Tabla 1) de acuerdo con las posiciones de Kabat, CCG, Chothia, IMGT

y North son lineales, es decir los aminoácidos de la respectiva cadena de la molécula de longitud completa están numerados de manera consecutiva comenzando a partir del número 1 en el extremo N terminal y terminando en el número que corresponde con el número total de aminoácidos en dicha molécula. Por ejemplo, una cadena pesada que consiste en 118 aminoácidos de longitud comenzará con el número 1 en el extremo N terminal y terminará con el número 118 en el aminoácido del extremo C terminal. Por lo tanto, cualquier referencia a por ejemplo, la posición 25 significa el aminoácido número 25 contado desde el extremo N terminal de esta molécula.

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la presente invención, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6.

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la presente invención, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16.

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la presente invención, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26.

En una forma de realización preferida de la molécula de unión de la presente invención, el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:36.

De acuerdo con la presente invención, los términos “dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina” y “dominio variable de cadena liviana de inmunoglobulina” se usan de acuerdo con las definiciones en el arte.

De manera específica, la molécula de unión de la presente invención, el por lo menos un sitio de unión al antígeno anti-CDH3 se selecciona de los sitios de unión al antígeno descritos precedentemente en la presente, mientras que el sitio de unión al antígeno anti-TRAILR2 es seleccionado por el experto entre aquellos sitios de unión al antígeno específicos de TRAILR2 disponibles en el arte o entre aquellos que se describen en la presente.

Preferiblemente, dicho sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a TRAILR2 es un fragmento de cadena variable único (scFv). Más preferiblemente, dicho scFv está dispuesto de manera que el dominio variable de cadena pesada se encuentra en su extremo N terminal y el dominio variable de cadena liviana se encuentra en su extremo C terminal.

Los métodos para unir los polipéptidos de interés, que incluyen a las moléculas scFv, por ejemplo, al extremo C terminal de la cadena pesada de una molécula IgG son bien conocidos en el arte. Se apreciará que dicha fusión del scFv a la molécula de Ig puede ser una fusión directa o puede ser mediante un conector, preferiblemente un conector peptídico, como se describió precedentemente. En la práctica, la unión típicamente se realiza mediante la

combinación de la molécula de ácido nucleico que codifica para la IgG de interés con el ácido nucleico que codifica para el polipéptido deseado, por ejemplo, el scFv, separados cuando sea necesario por la molécula de ácido nucleico que codifica para la secuencia conectora, formando de esta manera una molécula de ácido nucleico individual que comprende los tres elementos. Entonces, esta molécula de ácido nucleico completa que codifica para HC-scFv se coloca en un vector de expresión y se introduce en células huésped apropiadas de manera que se forme el polipéptido individual constituido por cadena pesada-scFv de IgG completo y opcionalmente, se hace lo mismo para la contraparte de cadena liviana-scFv de IgG.

En una forma de realización específica de la molécula de unión de la invención, el sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a TRAILR2 (el primer sitio de unión al antígeno) es un sitio de unión al antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72 y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76.

Por lo tanto, en un aspecto específico, la molécula de unión que se describe en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6; y por lo menos uno, preferiblemente dos, sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a TRAILR2 que comprenden un dominio variable

de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72 y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76.

En otro aspecto específico, la molécula de unión que se describe en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12 y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16; y por lo menos uno, preferiblemente dos, sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a TRAILR2 que comprenden un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72 y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76.

En otro aspecto específico, la molécula de unión que se describe en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22 y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26; y por lo menos uno, preferiblemente dos, sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a TRAILR2 que comprenden un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

NO:72 y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76.

En aún otro aspecto específico, la molécula de unión que se describe en la presente comprende un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 que comprende dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:36; y por lo menos uno, preferiblemente dos, sitios de unión al antígeno que se unen de manera específica a TRAILR2 que comprenden un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72 y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76.

En una forma de realización preferida de la invención, la molécula de unión comprende:

- i. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:80 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81;
- ii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83;
- iii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85; o

iv. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87.

En una forma de realización específica, la molécula de unión provista en la presente comprende:

i. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:80, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:80, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:81;

ii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:82, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:83;

iii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 , o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:84, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85, o una secuencia de aminoácidos

que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:85; o

iv. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:86, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:87.

En un aspecto específico, la molécula de unión que se describe en la presente comprende, por lo tanto, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:80, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:80, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:81; y por lo menos uno, preferiblemente dos, scFv que tienen especificidad para TRAILR2 y que comprenden o consisten en un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:72, y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76, o una secuencia de aminoácidos que tiene

por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:76. En una forma de realización preferida, el por lo menos uno o más scFv que se unen de manera específica a TRAILR2 que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:71.

En otro aspecto específico, la molécula de unión que se describe en la presente comprende, por lo tanto, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:82, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:83; y por lo menos uno, preferiblemente dos, scFv que tienen especificidad para TRAILR2 y que comprenden o consisten en un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:72, y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:76. . En una forma de realización preferida, el por lo menos uno o más scFv que se unen de manera

específica a TRAILR2 que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.71.

En otro aspecto específico, la molécula de unión que se describe en la presente comprende, por lo tanto, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 , o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:84, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:85; y por lo menos uno, preferiblemente dos, scFv que tienen especificidad para TRAILR2 y que comprenden o consisten en un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:72, y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:76. En una forma de realización preferida, el por lo menos uno o más scFv que se unen de manera específica a TRAILR2 comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.71.

En aún otro aspecto específico, la molécula de unión que se describe en la presente comprende, por lo tanto, una cadena pesada que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:86, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:87; y por lo menos uno, preferiblemente dos, scFv que tienen especificidad para TRAILR2 y que comprenden o consisten en un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:72, y un dominio variable de cadena liviana variable de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:76. En una forma de realización preferida, el por lo menos uno o más scFv que se unen de manera específica a TRAILR2 comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.71.

En una forma de realización específica, la molécula de unión de la invención comprende una cadena pesada modificada, preferiblemente en donde un scFv específico de TRAILR2 está fusionado al extremo C terminal de una cadena pesada de Ig. Preferiblemente, dicha cadena pesada modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:21, o SEQ ID NO:31. De manera específica, la molécula de unión de

la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:21, o SEQ ID NO:31.

De manera específica, la molécula de unión de la invención comprende:

- i. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81;
- ii. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83;
- iii. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:21 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85; o
- iv. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87.

En una forma de realización preferida, la molécula de unión que se describe en la presente comprende, por lo tanto, una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:1, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%,

por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:81.

En otra forma de realización preferida, la molécula de unión que se describe en la presente comprende, por lo tanto, una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:11, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:83.

En otra forma de realización preferida, la molécula de unión que se describe en la presente comprende, por lo tanto, una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:21, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:21, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:85.

En otra forma de realización preferida, la molécula de unión que se describe en la presente comprende, por lo tanto, una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ

ID NO:31, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:87.

En la presente también se describen moléculas biespecíficas de unión que tienen por lo menos un sitio de unión al antígeno (un primer sitio de unión al antígeno) que se une de manera específica a receptor de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2), como se describe con detalle precedentemente, y por lo menos un sitio de unión al antígeno (un segundo sitio de unión al antígeno) que se une de manera específica al dominio extracelular 2 (dominio EC2) de cadherina-3 (CDH3).

En un aspecto, la molécula de unión provista en la presente se une entonces a un antígeno que comprende o consiste en la SEQ ID NO:100, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:100.

Preferiblemente, dicho por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica al dominio EC2 de CDH3 se selecciona del grupo que consiste en:

i. un sitio de unión al antígeno que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:43 (CDR1), SEQ ID NO:44 (CDR2) y SEQ ID NO:45 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:47 (CDR1), SEQ ID NO:48 (CDR2) y SEQ ID NO:49 (CDR3);

ii. un sitio de unión al antígeno que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:53 (CDR1), SEQ ID NO:54 (CDR2) y SEQ ID NO:55 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:57 (CDR1), SEQ ID NO:58 (CDR2) y SEQ ID NO:59 (CDR3); y

iii. un sitio de unión al antígeno que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:63 (CDR1), SEQ ID NO:64 (CDR2) y SEQ ID NO:65 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) y SEQ ID NO:69 (CDR3).

Incluso más preferiblemente, el sitio de unión al antígeno que se une de manera específica al dominio EC2 de CDH3 se selecciona del grupo que consiste en:

i. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:46;

ii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:52 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56; y

iii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:62 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:66.

Preferiblemente, la molécula de unión que se describe en la presente y que tiene especificidad dirigida al dominio EC2 de CDH3 comprende:

i. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:88 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:89;

ii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:90 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91;

iii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:93.

En un aspecto específico, la molécula de unión dirigida contra TRAILR2 y el dominio EC2 de CDH3 comprende una cadena pesada modificada, preferiblemente en donde un scFv específico de TRAILR2 está fusionado al extremo C terminal de una cadena pesada de Ig. Preferiblemente, dicha cadena pesada modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:51, o SEQ ID NO:61. De manera específica, dicha molécula de unión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:51, o SEQ ID NO:61.

De manera específica, dicha molécula de unión comprende:

i. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:41 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:89;

ii. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:51 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91; o

iii. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:61 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:93.

Moléculas de anticuerpo monoespecíficas de la invención

En la presente también se proveen moléculas de anticuerpo (por ejemplo, una molécula de anticuerpo/inmunoglobulina de longitud completa que tiene una estructura con forma de Y con dos cadenas pesadas y dos livianas, o fragmentos de la misma tal como un fragmento Fv, Fab, Fab', o F(ab')₂, un anticuerpo de cadena individual, fragmento variable de cadena única (scFv)) que se unen de manera específica a CDH3. De manera específica, en la presente se proveen moléculas de anticuerpo que se unen de manera específica al dominio EC1 o al EC2 de CDH3. En algunas formas de realización, las moléculas de anticuerpo específicas de CDH3 son anticuerpos monoclonales recombinantes, moléculas de anticuerpo quiméricas, humanizadas o de humano.

En algunas formas de realización la molécula de anticuerpo específico de CDH3 comprende cualquiera de las siguientes combinaciones de CDR que se muestran en (i) a (vii):

i. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:3 (CDR1), SEQ ID NO:4 (CDR2) y SEQ ID NO:5 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3);

ii. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de

aminoácidos de las SEQ ID NO:17 (CDR1), SEQ ID NO:18 (CDR2) y SEQ ID NO:19 (CDR3);

iii. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:23 (CDR1), SEQ ID NO:24 (CDR2) y SEQ ID NO:25 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:27 (CDR1), SEQ ID NO:28 (CDR2) y SEQ ID NO:29 (CDR3);

iv. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:33 (CDR1), SEQ ID NO:34 (CDR2) y SEQ ID NO:35 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) y SEQ ID NO:39 (CDR3);

v. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:43 (CDR1), SEQ ID NO:44 (CDR2) y SEQ ID NO:45 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:47 (CDR1), SEQ ID NO:48 (CDR2) y SEQ ID NO:49 (CDR3);

vi. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:53 (CDR1), SEQ ID NO:54 (CDR2) y SEQ ID NO:55 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:57 (CDR1), SEQ ID NO:58 (CDR2) y SEQ ID NO:59 (CDR3); o

vii. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:63 (CDR1), SEQ ID NO:64 (CDR2) y SEQ ID NO:65 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de

aminoácidos de las SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) y SEQ ID NO:69 (CDR3).

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:3 (CDR1), SEQ ID NO:4 (CDR2) y SEQ ID NO:5 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3).

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:17 (CDR1), SEQ ID NO:18 (CDR2) y SEQ ID NO:19 (CDR3).

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:23 (CDR1), SEQ ID NO:24 (CDR2) y SEQ ID NO:25 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:27 (CDR1), SEQ ID NO:28 (CDR2) y SEQ ID NO:29 (CDR3).

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que

comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:33 (CDR1), SEQ ID NO:34 (CDR2) y SEQ ID NO:35 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) y SEQ ID NO:39 (CDR3).

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:43 (CDR1), SEQ ID NO:44 (CDR2) y SEQ ID NO:45 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:47 (CDR1), SEQ ID NO:48 (CDR2) y SEQ ID NO:49 (CDR3).

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:53 (CDR1), SEQ ID NO:54 (CDR2) y SEQ ID NO:55 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:57 (CDR1), SEQ ID NO:58 (CDR2) y SEQ ID NO:59 (CDR3).

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:63 (CDR1), SEQ ID NO:64 (CDR2) y SEQ ID NO:65 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de

aminoácidos de las SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) y SEQ ID NO:69 (CDR3).

En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo específica para CDH3 comprende:

- i. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6;
- ii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16;
- iii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26;
- iv. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:36
- v. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:46;
- vi. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:52 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56; o
- vii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:62 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:66.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que

comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y un dominio variable de cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:36.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:46.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que

comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:52 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:62 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:66.

En algunas formas de realización, los anticuerpos específicos para CDH3 como se definieron precedentemente además comprenden los dominios constantes de la cadena pesada de humano (por ejemplo, un dominio constante de IgG) y un dominio constante de la cadena liviana de humano (por ejemplo, un dominio constante de cadena liviana kappa o lambda).

En una forma de realización específica de la molécula de anticuerpo específica para CDH3, dicha molécula de anticuerpo comprende:

- i. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:80 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81;
- ii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83;
- iii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85;

iv. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87;

v. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:88 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:89;

vi. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:90 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91;

vii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:93.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:80 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO:84 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:88 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:89.

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:90 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91

De manera específica, en la presente se provee un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:93.

Los anticuerpos específicos para CDH3 provistos en la presente se pueden usar para marcaje, localización, identificación o direccionamiento a células que expresan CDH3 *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* (por ejemplo, en ensayos

de ELISA, análisis por FACS, inmunohistología o similares) mediante la unión de un colorante, un fármaco u otra molécula con especificidad de unión por un antígeno diferente. En algunas formas de realización, los anticuerpos específicos para CDH3 se unen de manera específica a la superficie de una célula que expresa CDH3 y se usan para la localización y/o identificación de dichas. En algunas formas de realización, los anticuerpos dirigidos contra CDH3 que se proveen en la presente se usan para identificar células que expresan CDH3 (por ejemplo, células tumorales). En algunas formas de realización, los anticuerpos dirigidos contra CDH3 que se proveen en la presente se usan para la administración de un fármaco o agente citotóxico a una célula diana (por ejemplo, una célula tumoral que expresa CDH3) mediante la unión de dicho fármaco o agente citotóxico a dicho anticuerpo dirigido contra CDH3, matando de esta manera, por ejemplo, a dicha célula diana.

En la presente también se provee un método para detectar a cadherina-3 (CDH3) en una muestra, en donde el método comprende los pasos de:

- (a) poner en contacto la muestra con una molécula de anticuerpo anti-CDH3 como se define en la presente precedentemente;
- (b) permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno en la muestra; y
- (c) detectar el anticuerpo anti-CDH3.

Los medios y los métodos para detectar a los anticuerpos son bien conocidos en el arte e incluyen por ejemplo, inmunohistoquímica, Inmunotransferencia y ELISA.

Los métodos para identificar si un tumor en particular expresa TRAILR2 y/o CDH3, son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, se puede usar

inmunohistoquímica para determinar si un tejido tumoral expresa TRAILR2 y/o CDH3 (por ejemplo, usando las moléculas de anticuerpo anti-TRAILR2 y/o anti-CDH3 que se describen en la presente).

En la presente también se provee un kit para detectar cadherina-3 (CDH3), en donde el kit comprende una molécula de anticuerpo anti-CDH3 como se define precedentemente en la presente, e instrucciones para su uso.

En la presente también se provee un kit para detectar cadherina-3 (CDH3) y TRAILR2, en donde el kit comprende una molécula de anticuerpo anti-CDH3, preferiblemente como se define precedentemente en la presente, y una molécula de anticuerpo anti-TRAILR2, e instrucciones para su uso.

Moléculas de ácidos nucleicos, vectores de expresión y células huésped de la invención

La presente invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico que codifica las moléculas de unión biespecíficas o las moléculas de anticuerpo que se describen en la presente, o una parte de las mismas. La presente invención abarca adicionalmente a un conjunto de moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de unión biespecífica o las moléculas de anticuerpo que se describen en la presente.

De acuerdo con la presente invención, dicha molécula de ácido nucleico “codifica” la molécula de unión de la invención o una parte de la misma, lo que significa que la molécula de ácido nucleico se provee en una forma expresable, es decir, en una forma que asegura que la molécula de unión de la presente invención (o la parte respectiva de la misma) se pueda expresar a partir de la misma.

En algunas formas de realización, las moléculas de unión de la invención

o la molécula de anticuerpo de la invención comprenden polipéptidos de la cadena pesada y/o de la cadena liviana del anticuerpo. Como podrán apreciar los especialistas en la materia, las moléculas de ácido nucleico que codifiquen polipéptidos de la cadena pesada, polipéptidos de la cadena liviana o polipéptidos de la cadena pesada y de la cadena liviana se pueden preparar fácilmente.

El término "una parte del mismo (o de la misma)" refleja el hecho de que no es necesario que todos los elementos de la molécula de unión de la presente invención estén codificados en una sola molécula de ácido nucleico, como podrán apreciar los especialistas en la materia. En cambio, se pueden usar dos o más moléculas de ácido nucleico para que codifiquen individualmente ciertas partes de la molécula de unión de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención también abarca un conjunto de moléculas de ácido nucleico aisladas, donde el conjunto codifica a todas las partes de la molécula de unión de la presente invención, de manera que la expresión de este conjunto de moléculas de ácido nucleico aisladas da como resultado la generación de una molécula de unión de la presente invención completa. En otras palabras, en la presente se proveen una o más moléculas de ácido nucleico, que codifican las cadenas polipeptídicas individuales de la molécula de unión de la presente invención, incluyendo a las cadenas pesadas, las cadenas livianas, los scFv, así como a sus combinaciones, ya sea por separado en moléculas de ácido nucleico individuales o combinadas en una molécula de ácido nucleico.

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN que comprende secuencias codificantes. Más preferentemente, dicha molécula de ADN comprende adicionalmente secuencias reguladoras y, opcionalmente,

intrones naturales o artificiales (por ejemplo por ejemplo, el intrón de β -globina de *Homo sapiens* con casete de expresión de miRNA-557 incluido en el mismo). La misma puede tener sus codones originales o puede tener un uso de codones optimizado que se ha adaptado específicamente para la expresión en la célula u organismo huésped que se desee. Basándose en la información sobre las secuencias de aminoácidos para la molécula de unión de la invención que se provee en la presente, un especialista en la materia puede preparar o puede obtener fácilmente dichas moléculas de ácido nucleico de la invención basándose en métodos conocidos *per se*, por ejemplo mediante síntesis automatizada de ADN, aislamiento de una fuente natural y/o tecnología de ADN recombinante.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen, pero de manera no taxativa a, las moléculas de ADN que codifican las secuencias polipeptídicas que se muestran en la lista de secuencias. La presente invención contempla además moléculas de ácido nucleico complementarias a las moléculas de ADN definidas anteriormente, así como moléculas de ácido nucleico que se hibridizan con ellas en condiciones de unión y lavado de alta rigurosidad, como se define en WO 2007/042309. Las moléculas preferidas (desde una perspectiva del ARNm) son aquellas que tienen por lo menos un 75 % o un 80 % (preferiblemente por lo menos un 85 %, de manera más preferible por lo menos un 90 % y más preferiblemente por lo menos un 95 %) de homología o identidad de secuencia con una de las moléculas de ADN según se describe en la presente. A manera de ejemplo, si la meta es expresar la molécula de unión biespecífica o la molécula de anticuerpo de la presente invención en células eucariotas, las secuencias de ADN se deberán diseñar de manera que coincidan con el uso de codones en

células eucariotas. Si se desea expresar los anticuerpos en *E. coli* u otros sistemas procarióticos, estas secuencias se deberán diseñar de manera que coincidan con el uso de codones de *E. coli* o el sistema procariótico respectivo. Las variantes de las moléculas de ADN de la invención se pueden construir de diversas formas diferentes, como se describe, por ejemplo, en WO 2007/042309.

Preferiblemente, el o los ácido(s) nucleico(s) son aislado(s), donde el término "aislado" se definió anteriormente.

La presente invención se refiere además a un vector de expresión que comprende la(s) molécula(s) de ácido nucleico de la invención.

Para producir las moléculas de unión o los anticuerpos de la invención, las moléculas de ADN que codifican las moléculas de unión o las moléculas de anticuerpo que se describen aquí o partes de las mismas se insertan en un vector de expresión de manera que las secuencias se unen operativamente a las secuencias de control transcripcional y de traducción.

Para elaborar las moléculas de unión o los anticuerpos de la invención, los especialistas en la materia puede elegir entre una gran variedad de sistemas de expresión bien conocidos en la técnica, por ejemplo los que figuran en la revisión de Kipriyanov y Le Gall, Curr Opin Drug Discov Devel., marzo de 2004; 7(2):233-42.

De acuerdo con la presente invención, el vector es un vector de expresión, es decir, un vector que puede proveer la expresión *in vitro* y/o *in vivo* del polipéptido respectivo a partir de la molécula de ácido nucleico codificante (por ejemplo, en una célula huésped adecuada, un organismo huésped y/o un sistema de expresión). Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, cósmidos, episomas derivados de EBV y otros similares. Normalmente, el vector

de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan de manera que sean compatibles con la célula huésped. Por lo general, los vectores de expresión comprenden por lo menos una molécula de ácido nucleico de la invención que está unida operativamente a uno o más elementos reguladores adecuados, tales como promotores, potenciadores, terminadores y otros similares. Algunos ejemplos específicos de dichos elementos reguladores y otros elementos, tales como factores de integración, marcadores de selección, secuencias señal o directrices, genes informantes y otros similares, útiles o necesarios para expresar polipéptidos de la invención, se divulgan, por ejemplo, en las páginas 131 a 133 de WO2006/040153.

Algunos ejemplos no limitativos de secuencias de promotores (ejemplificados para la expresión en células de mamífero) son promotores y/o potenciadores derivados de CMV (tales como el promotor/potenciador de CMV de citomegalovirus humano o el promotor/potenciador de CMV Simian Virus 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el principal promotor tardío de adenovirus (AdMLP)), polioma y promotores fuertes de mamíferos tales como inmunoglobulina nativa y promotores de actina. Algunos ejemplos de señales de poliadenilación son poliA de hormona de crecimiento de hámster o poliA de hormona de crecimiento bovino, poliA tardío o temprano de SV40; como alternativa, se pueden usar 3'UTR de genes de inmunoglobulina, etc.

Los vectores de expresión recombinantes también pueden portar secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación, como el origen de replicación ColE1 (pUC)) y genes marcadores seleccionables (como, por ejemplo, un gen de β -lactamasa para conferir resistencia a la ampicilina para la amplificación de los plásmidos en

E. coli). El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción del polipéptido resultante. La molécula de ácido nucleico que codifica la respectiva cadena polipeptídica se puede clonar en el vector de manera que el péptido señal se una en el marco al extremo amino de la cadena de la molécula de ácido nucleico de longitud completa madura. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido heterólogo de una proteína que no es de inmunoglobulina. Como alternativa, la secuencia de ADN que codifica las cadenas completas de la proteína de la invención puede ya contener una secuencia de péptido señal.

Como se indicó anteriormente, las secuencias de codificación insertadas en el vector se pueden sintetizar por ejemplo utilizando métodos estándar, o se pueden aislar de fuentes naturales o se pueden producir de manera semisintética, es decir, mediante la combinación de síntesis química y técnicas recombinantes. La conexión de las secuencias codificantes con elementos reguladores de la transcripción y/o con otras secuencias codificantes de aminoácidos se puede llevar a cabo usando métodos establecidos. Un enfoque que se emplea frecuentemente es, por ejemplo, usar vectores que codifican una secuencia de inmunoglobulina CH (pesada constante) humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados diseñados para que se pueda insertar y expresar fácilmente cualquier sitio de unión al antígeno, tal como una secuencia Fab de cadena única o cualquier dominio variable de la cadena pesada/liviana. Para la cadena pesada del anticuerpo, puede ser, sin limitación, cualquier isotipo de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) u otras inmunoglobulinas, incluyendo a las variantes alélicas.

En aquellos casos en los que se requiere más de una molécula de ácido

nucleico para formar la molécula de unión de la presente invención, estas más de una molécula de ácido nucleico se pueden insertar en diferentes vectores de expresión o en el mismo. En este último caso, pueden estar bajo el control de los mismos elementos regulatorios, por ejemplo promotores, potenciadores, terminadores y otros similares, o cada uno puede tener su propio conjunto de elementos reguladores. De acuerdo con la presente invención, se prefiere particularmente que, en aquellos casos en los que más de una molécula de ácido nucleico codifica los elementos individuales de la molécula de unión de la presente invención, todas las moléculas de ácido nucleico individuales requeridas para formar la molécula de unión de la presente invención estén presentes en un solo vector de expresión y, preferiblemente, que cada molécula de ácido nucleico tenga su propio conjunto de elementos reguladores.

Los vectores de expresión que comprenden estas moléculas de ADN se pueden introducir en células huésped, por ejemplo en células bacterianas o células eucariotas (superiores), por ejemplo en células de mamífero, de acuerdo con métodos de transfección bien conocidos en la técnica, que incluyen transfección mediada por liposomas, transfección mediada por policationes, fusión de protoplastos, microinyecciones, precipitación con fosfato de calcio, electroporación o transferencia mediante vectores virales.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a una célula huésped transfectada con el vector o vectores de expresión de la invención.

La célula huésped puede ser cualquier célula adecuada conocida en la técnica, incluyendo a las células procariotas, como las bacterias, así como las células eucariotas, como las células de levadura o las células de mamífero. Algunos ejemplos no limitantes de células de mamífero incluyen, de manera no

taxativa, líneas celulares humanas, de ratón, de rata, de mono y de roedor. Las líneas celulares de mamífero específicas disponibles como células huésped para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células SP2/0, células HeLa, células de riñón de crías de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma humano (por ejemplo, células Hep G2 y A-549), células 3T3 o los derivados/progenie de cualquiera de dichas líneas celulares. Los medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped que se acaban de describir son conocidos en la técnica.

Métodos de Elaboración y Preparación

Para elaborar los anticuerpos de la invención, los especialistas en la materia pueden seleccionar entre una variedad de métodos bien conocidos en la técnica.

Para la producción de anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas completas y dos cadenas livianas completas, como las del tipo IgG1 o IgG4, véase Norderhaug y col., J Immunol Methods 1997, 204 (1): 77-87; Kipriyanow y Le Gall, Molecular Biotechnology 26: 39-60, 2004; Shukla y col., 2007, J. Chromatography B, 848(1): 28-39.

Las moléculas de Fab se pueden producir mediante la expresión de ácidos nucleicos que codifican dichas construcciones en células huésped, por ejemplo de *E. coli*, *Pichia pastoris* o líneas celulares de mamíferos (por ejemplo, CHO o NS0). En la técnica se conocen procesos que permiten el realizar el plegamiento, la asociación y los enlaces disulfuro adecuados de estas cadenas para obtener moléculas Fab funcionales que comprenden un fragmento Fd y una cadena liviana (Burtet y col., J. Biochem. 2007, 142(6), 665- 669; Ning y col., Biochem.

Mol. Biol. 2005, 38: 204-299; Quintero-Hernandez y col., Mol. Immunol. 2007, 44: 1307-1315; Willems y col. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003; 786:161-176).

También se conocen procesos para elaborar anticuerpos scFv mediante la expresión recombinante de ácidos nucleicos que codifican construcciones de scFv en células huésped (por ejemplo de *E. coli*, *Pichia pastoris* o líneas celulares de mamíferos, por ejemplo, CHO o NS0), que producen moléculas scFv funcionales (Rippmann y col., Applied and Environmental Microbiology 1998, 64(12): 4862-4869, Yamawaki y col., J. Biosci. Bioeng. 2007, 104(5): 403-407, Sonoda y col., Protein Expr. Purif. 2010, 70(2): 248-253).

Específicamente, en la presente se provee un método para producir la molécula de unión o la molécula de anticuerpo que se describe en la presente, donde dicho método comprende los siguientes pasos:

- (a) cultivar la célula huésped de la invención en condiciones que permitan la expresión de la molécula de unión de la invención;
- (b) opcionalmente recuperar dicha molécula; y, opcionalmente,
- (c) purificar y/o modificar y/o formular adicionalmente dicha molécula de unión.

Las proteínas de la invención se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de la proteína por parte de las células huésped.

Las condiciones adecuadas para cultivar un huésped procariótico o eucariótico son bien conocidas por los especialistas en la materia. Para aumentar el rendimiento y la solubilidad del producto de expresión, el medio se puede amortiguar o complementar con aditivos adecuados que se sabe que potencian

o facilitan ambos efectos. Por lo general, los especialistas también son conscientes de que puede ser necesario adaptar estas condiciones a las necesidades del huésped y a los requisitos de la molécula a expresar. En caso de que un promotor inducible controle la(s) molécula(s) de ácido nucleico de la invención en el(los) vector(es) presente(s) en la célula huésped, la expresión de la molécula de interés se puede inducir mediante el agregado de un agente inductor apropiado. Los especialistas conocen protocolos y estrategias de expresión adecuados.

Luego de eso se recuperan las moléculas de unión de la presente invención y, cuando es necesario, se las purifica adicionalmente. Preferiblemente se recuperan del medio de cultivo como moléculas secretadas. Sin embargo, también se pueden recuperar de lisados de células huésped si, por ejemplo, fueron expresadas sin una señal secretoria. Se apreciará que el término "recuperar dicha molécula" se refiere a aislar la molécula de unión de la presente invención codificada por la(s) molécula(s) de ácido nucleico de la invención, es decir, la molécula de unión que está presente en la célula huésped de la invención debido a la transformación o transfección de dicha célula huésped con la molécula de ácido nucleico o el vector de la invención.

Un paso opcional de purificación de la molécula de unión de la presente invención contribuye además a obtener preparados sustancialmente homogéneos de la molécula. Los medios y métodos para purificar una molécula de interés son bien conocidos y los especialistas en la materia pueden usar, por ejemplo, métodos estándar de purificación de proteínas que se utilizan para proteínas recombinantes y proteínas de células huésped y ajustarlos de manera apropiada para la molécula respectiva. A manera de ejemplo, los métodos de

purificación de última generación útiles para obtener moléculas de unión de la presente invención incluyen, como primera medida, la eliminación del medio de cultivo o lisado de las células y/o particulados de residuos celulares, seguido de la purificación para separar de contaminantes tales como proteínas, polipéptidos y ácidos nucleicos solubles, por ejemplo, mediante fraccionamiento en columnas de inmutuafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en Sephadex, cromatografía en gel de sílice o en una resina de intercambio catiónico.

Como paso final opcional en el proceso para obtener una molécula de unión de la presente invención, la molécula de proteína purificada se puede secar, por ejemplo mediante liofilización, según se describe a continuación, para aplicaciones terapéuticas, o se puede formular de otra manera según se desee. Además, la molécula de unión de la presente invención que se obtiene como resultado se puede someter a modificaciones adicionales, por ejemplo, para eliminar modificaciones postraduccionales no deseadas y otras modificaciones similares.

Composiciones farmacéuticas y usos médicos de la molécula de unión de la presente invención o de la composición farmacéutica

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende o consiste en una o más moléculas de unión o moléculas de anticuerpo según se describen en la presente. En una forma de realización, dichas una o más moléculas de unión son los únicos agentes farmacéuticamente activos. En una forma de realización alternativa, además de dichas una o más moléculas de unión, dicha composición comprende uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales, por ejemplo, según se los define más

adelante.

De acuerdo con la presente invención, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición para administrar a un paciente, preferiblemente a un paciente humano. La composición farmacéutica de la invención comprende los compuestos mencionados anteriormente, solos o en combinación. Opcionalmente puede comprender otras moléculas capaces de alterar las características de los compuestos de la invención, por ejemplo, estabilizando, modulando y/o activando su función. La composición puede estar en forma sólida, líquida o gaseosa y puede estar, entre otras, en forma de (a) polvo(s), por ejemplo un polvo liofilizado, (a) solución(es), (a) tableta(s) o aerosol(es). Preferiblemente, la composición es un polvo liofilizado o una solución.

Para ser utilizada en terapia, la molécula de unión biespecífica que se describe en la presente se formula en composiciones farmacéuticas apropiadas para facilitar la administración a animales o seres humanos. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención preferiblemente también comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular utilizando métodos convencionales bien conocidos. Normalmente, la composición farmacéutica que comprende la molécula de unión de la invención se puede formular mezclando la molécula de unión con dichos vehículos farmacéuticamente aceptables, así como (opcionalmente) excipientes o estabilizantes. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación no tóxico de cualquier tipo, ya sea sólido, semisólido o líquido. Además, otros excipientes, modificadores o estabilizadores

que no sean tóxicos en las dosis y concentraciones empleadas. Los vehículos, excipientes, modificadores y estabilizadores farmacéuticamente aceptables incluyen, de manera no taxativa, sistemas reguladores de pH tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos inorgánicos u orgánicos y sus sales; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metilparabeno o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona o polietilenglicol (PEG); aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, sacarosa, trehalosa, dextrinas o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; alditoles tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como el sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos iónicos o no iónicos tales como TWEEN™ (polisorbatos), PLURONICS™ o ésteres de ácidos grasos, éteres de ácidos grasos o ésteres de azúcares. Además, la formulación puede contener solventes orgánicos, tales como etanol o isopropanol. Los excipientes también pueden tener una función modificadora de la liberación o modificadora de la absorción.

Usualmente, se preferirán las soluciones o suspensiones acuosas. Por lo general, las formulaciones adecuadas para proteínas terapéuticas tales como las moléculas de unión de la invención son soluciones de proteína de pH regulado, tales como soluciones que incluyen la proteína en una concentración adecuada

(por ejemplo de entre 0,001 y 400 mg/ml, preferiblemente entre 0,005 y 200 mg/ml, de manera más preferible entre 0,01 y 200 mg/ml, de manera aún más preferible entre 1,0 y 100 mg/ml, por ejemplo entre 1,0 y 40,0 mg/ml, preferiblemente entre 10,0 y 30 mg/ml, de la manera más preferible, 30 mg/ml (administración i.v.). o 100 mg/ml (administración s.c.). y un regulador de pH acuoso, tal como:

- solución salina de pH regulado con fosfato, pH 7,4,
- otros reguladores de pH de fosfato, pH entre 6,2 y 8,2,
- reguladores de pH de acetato, pH entre 3,2 y 7,5, preferiblemente pH entre 4,8 y 5,5
- reguladores de pH de histidina, pH entre 5,0 y 7,0, preferiblemente pH entre 5,3 y 5,5
- reguladores de pH de succinato, pH entre 3,2 y 6,6, o
- reguladores de pH de citrato, pH entre 2,1 y 6,2,

y, opcionalmente, sales (por ejemplo, NaCl) y/o agentes estabilizantes (tales como, por ejemplo, sacarosa, trehalosa, lisina) y/u otros polialcoholes (tales como, por ejemplo, manitol y glicerol) para proveer isotonicidad a la solución, y opcionalmente detergentes, por ejemplo para evitar la formación de agregados (por ejemplo, 0,02 % de Tween-20 o Tween-80).

Las soluciones de proteínas de pH regulado preferidas para la administración i.v. son soluciones que incluyen aproximadamente 10 mg/ml de la molécula de unión de la invención disuelta en regulador de pH de citrato 10 mM, pH 5,5, sacarosa 207 mM, lisina HCl 25 mM y polisorbato 20 al 0,02 %.

Las soluciones de proteína de pH regulado particularmente preferidas para la administración i.v. son soluciones que incluyen aproximadamente 30

mg/ml de la molécula de unión de la invención disuelta en aproximadamente 20 mM de regulador de pH His/His-HCl, pH entre 5,3 y 5,5, preferiblemente pH 5,3, sacarosa 220 mM y polisorbato 20 al 0,02 %, y agua para inyección (WFI).

Las formulaciones para aplicación subcutánea pueden incluir concentraciones significativamente más altas del anticuerpo de la invención, por ejemplo hasta 100 mg/ml o incluso mayores de 100 mg/ml. Sin embargo, para los especialistas en la materia será claro que los ingredientes y las cantidades de los mismos que se acaban de indicar solo representan una opción preferida. Las alternativas y variaciones de las mismas serán inmediatamente evidentes para los especialistas en la materia o se pueden concebir fácilmente a partir de la anterior descripción.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar al sujeto utilizando cualquier modo de administración adecuado, incluyendo, por ejemplo, la administración parenteral por infusión o inyección (intravenosa, intraarticular, intramuscular, subcutánea, intraesternal, intraperitoneal, intradérmica), así como la administración transdérmica, intranasal, bucal u oral o la administración por inhalación. Para la administración de una solución o un polvo liofilizado reconstituido se prefieren los modos de administración parenteral.

Por lo general, para el tratamiento, prevención y/o alivio de las enfermedades, trastornos y condiciones que se mencionan en la presente, y dependiendo de la enfermedad, trastorno o condición específica a tratar, la potencia de la molécula de unión específica de la invención a usar, la vía de administración y la formulación o composición farmacéutica específica que se utilicen, influyen sobre la dosis real a administrar. Además, la cantidad

farmacéuticamente eficaz real o la dosificación terapéutica también dependerán de factores conocidos por los especialistas en la materia, como la edad y el peso del paciente. En cualquier caso, la molécula de unión de la invención o la composición farmacéutica de la invención se administrará en dosis, y de una manera que, permitan administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz que dependerá de la condición del paciente en particular. Preferiblemente, las moléculas de unión de la invención o la composición farmacéutica de la invención se administrarán en una cantidad entre 0,005 y 20,0 mg por kilogramo de peso corporal y en dosis, preferiblemente, de entre 0,05 y 10,0 mg/kg/dosis, y de manera más preferible entre 0,5 y 5 mg/kg/dosis, ya sea de forma continua (por ejemplo, por infusión) o de manera más preferible como dosis únicas. El intervalo de administración puede ser, por ejemplo, de dos veces por semana, o pueden ser dosis semanales o mensuales, pero esto puede variar de manera significativa, dependiendo especialmente de los parámetros mencionados anteriormente. Por lo tanto, en algunos casos puede ser suficiente usar menos de la dosis mínima que se acaba de mencionar, mientras que en otros casos puede ser necesario exceder el límite superior. Cuando se administren grandes cantidades, puede ser recomendable dividir las en diversas tomas más pequeñas repartidas a lo largo del día. Preferiblemente, la administración es una vez por semana en un rango de dosis de entre 0,005 y 20,0 mg por kilogramo de peso corporal y dosis, preferiblemente, de entre 0,05 y 10,0 mg/kg/dosis, y de manera más preferible de entre 0,5 y 5 mg/kg/dosis.

La eficacia de las moléculas de unión de la invención, y de las composiciones que las comprenden, se puede probar utilizando cualquier ensayo *in vitro* adecuado, cualquier ensayo basado en células, cualquier ensayo

in vivo y/o cualquier modelo animal conocido *per se*, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad específica de que se trate. Los especialistas en la materia tendrán claros cuáles son los ensayos y modelos animales adecuados, que incluyen, por ejemplo, los ensayos y modelos animales que se utilizan más adelante en los Ejemplos.

Las moléculas de unión de la invención o la composición farmacéutica de la invención se pueden usar solas o en combinación con otros ingredientes farmacológicamente activos, tales como compuestos de última generación o estándar, por ejemplo sustancias citostáticas o citotóxicas, inhibidores de proliferación celular, sustancias antiangiogénicas, esteroides, inmunomoduladores/inhibidores de puntos de control y otros similares.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención provee las moléculas de unión de la invención o una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión de la invención, junto con uno o más ingredientes activos adicionales y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las sustancias activas citostáticas y/o citotóxicas que se pueden administrar como pares de combinación de acuerdo con la presente invención incluyen, de manera no taxativa, a hormonas, análogos de hormonas y antihormonas, inhibidores de aromatasa, agonistas y antagonistas de LHRH, inhibidores de factores de crecimiento (factores de crecimiento tales como por ejemplo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), factor de crecimiento epidérmico humano (HER, por ejemplo HER2, HER3, HER4) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)),

los inhibidores son, por ejemplo, anticuerpos (anti)factor de crecimiento, anticuerpos (anti)receptor del factor de crecimiento e inhibidores de la tirosina quinasa, como por ejemplo cetuximab, gefitinib, afatinib, nintedanib, imatinib, lapatinib, bosutinib y trastuzumab; antimetabolitos (por ejemplo, antifolatos tales como metotrexato, raltitrexed, análogos de pirimidina como 5-fluorouracilo (5-FU), gemcitabina, irinotecan, doxorubicina, TAS-102, capecitabina y gemcitabina, análogos de purina y adenosina como mercaptopurina, tioguanina, cladribina y pentostatina, citarabina (ara C), fludarabina; antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas); derivados del platino (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino); agentes de alquilación (por ejemplo, estramustina, mecloretamina, melfalán, clorambucilo, busulfano, dacarbazina, ciclofosfamida, ifosfamida, temozolomida, nitrosoureas tales como, por ejemplo, carmustina y lomustina, tiotepa); agentes antimetabólicos (por ejemplo, alcaloides de la vinca tales como, por ejemplo, vinblastina, vindesina, vinorelbina y vincristina; y taxanos como paclitaxel, docetaxel); inhibidores de la angiogénesis, incluyendo a bevacizumab, ramucirumab y aflibercept, inhibidores de la tubulina; inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de PARP, inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, epípodofilotoxinas tales como, por ejemplo, etopósido y etopofos, tenipósido, amsacrina, topotecán, irinotecán, mitoxantrona), inhibidores de la serina/treonina quinasa (por ejemplo, inhibidores de PDK1, inhibidores de Raf, inhibidores de A-Raf, inhibidores de inhibidores de B-Raf, inhibidores de C-Raf, inhibidores de mTOR, inhibidores de mTORC1/2, inhibidores de PI3K, inhibidores de PI3K α , inhibidores dobles de mTOR/PI3K, inhibidores de STK33, inhibidores de AKT, inhibidores de PLK1 (tales como volasertib), inhibidores de CDK, incluyendo a los inhibidores de CDK9,

inhibidores de la Aurora quinasa), inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo, inhibidores de PTK2/FAK, inhibidores de MCL-1, inhibidores de c-FLIP o inhibidores de KRAS, como KRAS G12c, KRAS G12D o KRAS G13d), inhibidores de la interacción proteína-proteína, inhibidores de MEK, ERK inhibidores, inhibidores de FLT3, inhibidores de BRD4, inhibidores de IGF-1R, inhibidores de Bcl-xL, inhibidores de Bcl-2, inhibidores de Bcl-2/Bcl-xL, inhibidores del receptor ErbB, inhibidores de BCRABL, inhibidores de ABL, inhibidores de Src, análogos de rapamicina (por ejemplo everolimus, temsirolimus, ridaforolimus, sirolimus), inhibidores de la síntesis de andrógenos, inhibidores de los receptores de andrógenos, inhibidores de DNMT, inhibidores de HDAC, inhibidores de ANG1/2, inhibidores de CYP17, radiofármacos que incluyen, de manera no taxativa, agentes biofarmacéuticos sistémicos dirigidos, agentes inmunoterapéuticos tales como inhibidores de puntos de control inmunitarios (por ejemplo moléculas de unión a CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3 y TIM3/inmunoglobulinas, tales como ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab), interferón, interferón alfa o rituximab; virus oncolíticos; vacunas contra el cáncer y diversos agentes quimioterapéuticos tales como amifostina, anagrelida, clodronato, filgratina, leucovorina, procarbazona, levamisol, mesna, mitotano, pamidronato y porfímero; inhibidores del proteasoma (tales como Bortezomib); miméticos Smac y BH3; agentes que restablecen la funcionalidad de p53, incluyendo al antagonista de mdm2-p53; inhibidores de la vía de señalización Wnt/beta-catenina; moduladores estromales tales como moléculas (preferiblemente biespecíficas) dirigidas hacia CD137 y FAP; y/o inhibidores de la quinasa 9 dependiente de ciclina.

De acuerdo con la presente invención, son preferibles los tratamientos con

las moléculas de unión de la invención o la composición farmacéutica de la invención en combinación con un fármaco que se selecciona entre los siguientes:

(i) anticuerpos anti-VEGF (bevacizumab y otras sustancias antiangiogénicas) con o sin combinación de quimioterapia (incluyendo a la combinación de doxorrubicina/ciclofosfamida y/o la combinación de capecitabina/docetaxel en un entorno neoadyuvante; régimen de taxano/platino para el tratamiento de primera línea y posteriores), por ejemplo en particular en pacientes con cáncer de mama;

(ii) quimioterapéuticos (incluyendo a 5-fluorouracilo (5-FU), irinotecán, oxaliplatino y TAS-102);

(iii) anticuerpos anti-EGFR (cetuximab y panitumumab en tumores KRAS de tipo salvaje) con o sin combinación con quimioterapia (incluyendo a irinotecán), combinación con anticuerpos anti-VEGF (bevacizumab y otras sustancias antiangiogénicas) o combinación con regorafenib, por ejemplo para el tratamiento de pacientes con CRC; y/o

(iv) inhibidores de EGFR, tales como gefitinib, afatinib, nintedanib, lapatinib, erlotinib, asimertinib; y/o

(v) inhibidores de ALK; y/o

(vi) inhibidores de ROS1; y/o

(vii) agentes inmunoterapéuticos, incluyendo a agentes anti-PD-1 y anti-PD-L1 y agentes anti LAG3, tales como ezabenlimab, pembrolizumab y nivolumab y otros anticuerpos según se describe en WO2017/198741; y/o

(viii) moduladores estromales tales como moléculas (preferiblemente biespecíficas) dirigidas hacia CD137 y FAP.

En algunas formas de realización particularmente preferidas, la molécula

de unión de la invención o la composición farmacéutica de la invención se usan para el tratamiento del cáncer en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario, preferiblemente con un antagonista de PD-1, tal como un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PDL-1. Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-PD-1 se selecciona entre el grupo que consiste en pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab o PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 y PD1-5 según se describe en WO2017/198741 (que se incorpora aquí como referencia), de manera más preferible dicho anticuerpo anti-PD-1 es ezabenzumab. Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-PDL-1 se selecciona entre el grupo que consiste en atezolizumab, avelumab y durvalumab. Específicamente, dicha terapia se puede realizar en combinación con un agente quimioterapéutico, como por ejemplo cisplatino, carboplatino o gemcitabina.

En algunas formas de realización preferidas adicionales, la molécula de unión o la composición farmacéutica que se describen en la presente se usan para el tratamiento del cáncer en combinación con un solo agente quimioterapéutico, tal como cisplatino, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, 5-FU, metotrexato, cetuximab, capecitabina, afatinib, irinotecán, oxaliplatino, gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, capecitabina, pemetrexed o cetuximab.

En algunas formas de realización particularmente preferidas, la molécula de unión o la composición farmacéutica que se describen en la presente se usan para el tratamiento del cáncer en combinación con un régimen de combinación que se selecciona entre el grupo que consiste en:

- cetuximab, platino (cisplatino o carboplatino) y 5-FU;
- cisplatino y cetuximab;
- cisplatino o carboplatino combinado con docetaxel o paclitaxel;

- cisplatino y 5-FU;
- cisplatino o carboplatino combinado con docetaxel y cetuximab;
- cisplatino o carboplatino combinado con paclitaxel y cetuximab;
- pembrolizumab, platino (cisplatino o carboplatino) y paclitaxel;
- pembrolizumab, platino (cisplatino o carboplatino) y docetaxel;
- cisplatino y etopósido;
- carboplatino y etopósido; y
- ciclofosfamida en combinación con doxorubicina y vincristina.

En una forma de realización preferida, el cáncer a tratar con la molécula de unión que se describe en la presente es cáncer gástrico o adenocarcinoma esofágico y el método de tratamiento comprende una combinación de la molécula de unión que se describe en la presente y un agente quimioterapéutico que se selecciona entre el grupo que consiste en irinotecán, oxaliplatino, paclitaxel y capecitabina.

En una forma de realización preferida adicional, el cáncer a tratar con la molécula de unión que se describe en la presente es adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) y el método de tratamiento comprende una combinación de la molécula de unión que se describe en la presente y un agente quimioterapéutico que se selecciona entre el grupo que consiste en irinotecán, gemcitabina, paclitaxel y capecitabina.

En otra forma de realización preferida, el cáncer a tratar con la molécula de unión que se describe en la presente es adenocarcinoma de pulmón y el método de tratamiento comprende una combinación de la molécula de unión que se describe en la presente y un agente quimioterapéutico que se selecciona entre el grupo que consiste en oxaliplatino, docetaxel y pemetrexed. Preferiblemente,

el adenocarcinoma de pulmón se trata con una terapia combinada que comprende la molécula de unión de la invención, oxaliplatino y cisplatino.

En una forma de realización preferida adicional, el cáncer a tratar con la molécula de unión que se describe en la presente es carcinoma de células escamosas de pulmón (SCC pulmonar) y el método de tratamiento comprende una combinación de la molécula de unión que se describe en la presente y un agente quimioterapéutico que se selecciona entre el grupo compuesto por oxaliplatino, cisplatino y docetaxel. Preferiblemente, el SCC pulmonar se trata con una terapia de combinación que comprende la molécula de unión de la invención, oxaliplatino y cisplatino.

En otra forma de realización preferida adicional, el cáncer a tratar con la molécula de unión que se describe en la presente es carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN o HNSCC) y el método de tratamiento comprende una combinación de la molécula de unión que se describe en la presente y un agente quimioterapéutico que se selecciona entre el grupo que consiste en oxaliplatino, paclitaxel, docetaxel y cetuximab.

En una forma de realización adicional, la molécula de unión o la composición farmacéutica que se describen en la presente se usan para el tratamiento del cáncer en combinación con radioterapia.

La presente invención se refiere además a la molécula de unión de la invención, o a la composición farmacéutica de la invención, para usar en medicina. La presente invención se refiere además a la molécula de unión de la invención, o a la composición farmacéutica de la invención, para usar en la preparación de un medicamento.

Además, la presente invención también se refiere a la molécula de unión

de la invención, o a la composición farmacéutica de la invención, para usar en un método para tratar, mejorar o prevenir el cáncer. La presente invención se refiere además a un método para tratar, prevenir o mejorar el cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión de la invención, o de la composición farmacéutica de la invención.

La "cantidad terapéuticamente eficaz" de la molécula que se va a administrar es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar los síntomas clínicos del cáncer, en particular la cantidad mínima que es eficaz para el cáncer específico que se va a tratar.

Tal como se lo usa en la presente, el término "cáncer" se utiliza con la intención de incluir a todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos con transformaciones malignas, independientemente del tipo histopatológico o de la etapa de invasividad. Por lo tanto, es la intención que todos los tipos de cáncer, tumores, neoplasias, etc., que se mencionan más adelante y que se caracterizan por su ubicación/origen específico en el cuerpo, se consideren incluidos como tumores primarios así como los tumores metastásicos derivados de los mismos.

Los tipos de cáncer, tumores y otras enfermedades proliferativas cuyo crecimiento se puede inhibir usando las moléculas de unión multiespecíficas que se describen en la presente son cualquier tumor que exprese TRAILR2/CDH3, incluyendo, de manera no taxativa, a: cáncer de cabeza y cuello, preferiblemente HNSCC; cáncer de pulmón; preferiblemente NSCLC; cáncer de páncreas; cáncer de cuello uterino; cáncer de ovarios; cáncer endometrial; cáncer de mama, preferiblemente TNBC; cáncer de hígado (hepatoblastoma o carcinoma

hepatocelular); cáncer de próstata; sarcoma gástrico; tumores del estroma gastrointestinal, cáncer de esófago; cáncer de colon; cáncer colorrectal; cáncer renal; cáncer de piel; o tipos de cáncer gastrointestinales. Los tipos de cáncer gastrointestinales incluyen, de manera no taxativa, cáncer de esófago (por ejemplo, cáncer de la unión gastroesofágica), cáncer de estómago (gástrico), carcinoma hepatocelular, cáncer del tracto biliar (por ejemplo, colangiocarcinoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer de páncreas o cáncer colorrectal (CRC).

En una forma de realización preferida de la molécula de unión o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la invención, o del método de la invención para tratar, prevenir o mejorar el cáncer, o del uso de la invención, el cáncer es cáncer de pulmón, específicamente adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas de pulmón (SCC pulmonar) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC); cáncer de cabeza y cuello, específicamente carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC); cáncer de páncreas, específicamente adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC); cáncer de mama, específicamente cáncer de mama triple negativo (TNBC); cáncer gástrico (GC); cáncer de ovarios; cáncer de endometrio o cáncer de esófago.

En una forma de realización particularmente preferida de la invención, el cáncer es cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) o carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC).

El cáncer de páncreas (PAC) es una enfermedad maligna que causa más de 400.000 muertes al año en todo el mundo. Es una de las causas de muerte más comunes relacionada con el cáncer en los países industrializados. A pesar de las intervenciones terapéuticas como la cirugía y la quimioterapia, el

adenocarcinoma de páncreas, que representa ~90 % de todos los casos de cáncer de páncreas, suele tener un mal pronóstico, donde aproximadamente 25 % de las personas sobreviven un año y solo el 5 % de los pacientes sobreviven cinco años. El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es la enfermedad neoplásica del páncreas más predominante y representa más del 90 % de todas las neoplasias pancreáticas malignas.

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer en los Estados Unidos. La tasa de supervivencia relativa a 5 años de 2011 a 2017 para pacientes con cáncer de pulmón fue del 22 %. El NSCLC es cualquier tipo de cáncer de pulmón epitelial que no sea el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). Los tipos más comunes de NSCLC son carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes y adenocarcinoma, pero existen otros tipos que ocurren con menos frecuencia. Como clase, el NSCLC suele ser menos sensible a la quimioterapia y la radioterapia en comparación con el SCLC. Los pacientes con enfermedad resecable se pueden curar mediante cirugía o cirugía seguida de quimioterapia. Sin embargo, un gran número de pacientes tienen una enfermedad irresecable y el control local se puede realizar con radioterapia, pero se observa curación solo en un pequeño número de pacientes. Por lo tanto, existe una gran necesidad de disponer de agentes terapéuticos adicionales para tratar esta enfermedad.

La mayor parte de los tipos de cáncer de cabeza y cuello se derivan del epitelio de la mucosa en la cavidad oral, la faringe y la laringe y en conjunto se conocen como carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). Por lo general, los tipos de cáncer de la cavidad oral y laringe se asocian con el consumo de tabaco, el abuso de alcohol o ambos, mientras que los tipos de

cáncer de faringe se atribuyen cada vez más a la infección por el virus del papiloma humano (HPV), principalmente el HPV-16. Los tipos de cáncer de cabeza y cuello también pueden comenzar en las glándulas salivales, los senos paranasales o los músculos o nervios de la cabeza y el cuello, pero estos tipos de cáncer son mucho menos comunes que los carcinomas de células escamosas.

Por lo general, dependiendo del estadio de la enfermedad, el HNSCC de la cavidad oral se trata con resección quirúrgica, seguida de radiación coadyuvante o quimioterapia más radiación (que se conocen como quimiorradiación o quimiorradioterapia (CRT)). Con excepción de los tipos de cáncer de cavidad oral en etapa temprana (que se tratan solo con cirugía), el tratamiento de la mayor parte de los pacientes con HNSCC es complicado y requiere enfoques multimodales y, por lo tanto, atención multidisciplinaria. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de disponer de agentes terapéuticos dirigidos, para tratar pacientes con HNSCC y, en particular, pacientes en etapa tardía.

El cáncer colorrectal (CRC) es una enfermedad maligna distinta que figura en la ICD-10 y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad por cáncer en todo el mundo. Aproximadamente el 25 % de los pacientes con CRC se presentan con metástasis evidente y la enfermedad metastásica se desarrolla en el 40-50 % de los pacientes recién diagnosticados. Aunque las mejoras recientes en la quimioterapia han prolongado la duración de la supervivencia del CRC metastásico, la mayor parte de los pacientes sucumbirán a su enfermedad. Por lo tanto, existe una gran necesidad de disponer de agentes terapéuticos adicionales para tratar esta enfermedad.

Se sabe que entre aproximadamente 30 y 50 % de los tipos de cáncer colorrectales tienen un gen KRAS mutado (anormal). Las mutaciones de KRAS que se encuentran con frecuencia en las neoplasias incluyen las del exón 2 (codón 12 y 13) y el exón 3 (codón 61) y se pueden analizar a partir de biopsias tumorales. Incluyen mutaciones activadoras que dan como resultado una transducción continua de señales, estimulando las vías de señalización corriente abajo que intervienen en el crecimiento celular, la proliferación, la invasión y la metástasis. Por lo tanto, en una forma de realización, las moléculas de unión de la presente invención son para usar en el tratamiento de un cáncer colorrectal con mutación en el gen KRAS (es decir, pacientes con tumores con mutación en el gen KRAS). En una forma de realización alternativa, las moléculas de unión de la presente invención son para usar en el tratamiento de un cáncer colorrectal con KRAS de tipo salvaje (es decir, pacientes con tumores con KRAS de tipo salvaje).

El cáncer de esófago se encuentra entre los tipos de cáncer que se diagnostican con mayor frecuencia en todo el mundo. Al igual que el cáncer de páncreas, el diagnóstico es difícil y tiende a ocurrir en etapas ya avanzadas, lo que lleva a un mal pronóstico para esta indicación. Como consecuencia, representa aproximadamente el 5 % de las muertes relacionadas con el cáncer, lo que la convierte en la sexta causa de muerte relacionada con el cáncer.

Con aproximadamente 2,3 millones de casos nuevos en todo el mundo (GLOBOSCAN 2020), el cáncer de mama es la neoplasia maligna que se diagnostica con mayor frecuencia entre las mujeres. El cáncer de mama triple negativo (TNBC) constituye el 15-20 % de los tipos de cáncer de mama y se presenta con mayor frecuencia en mujeres menores de 40 años. Debido a su

naturaleza altamente invasiva, en casi el 50 % de los pacientes el TNBC es acompañado de metástasis a distancia. Los pacientes con TNBC muestran un tiempo de supervivencia más corto en comparación con otros tipos de cáncer de mama, por ejemplo una tasa de mortalidad a los 5 años de aproximadamente 40 % y una tasa de mortalidad después de la recurrencia de la enfermedad de hasta 75 %. Las terapias endocrinas o moleculares dirigidas que se utilizan actualmente en otros subtipos de CM no representan una opción para el TNBC debido a su fenotipo molecular. Dado que la eficacia de los tratamientos TNBC sistémicos basados en quimioterapia, como la quimiorradioterapia coadyuvante postoperatoria es muy baja, existe una gran necesidad de desarrollar nuevas modalidades terapéuticas para esta enfermedad.

El cáncer de ovario representa el séptimo tipo de cáncer más común en las mujeres en todo el mundo y tiene la morbilidad más alta entre los tumores malignos en las mujeres. De los tipos de carcinoma epitelial, el carcinoma seroso de ovario es el más predominante. En aproximadamente el 80 % de los casos el cáncer de ovario se diagnostica en una etapa tardía y, por lo tanto, suele tener un mal pronóstico. Especialmente para el cáncer de ovario recurrente, los tratamientos actuales se caracterizan por su alta intensidad, baja calidad de vida y baja probabilidad de curación. Por lo tanto, existe una urgente necesidad de disponer de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad.

Como se indicó anteriormente, los inventores han identificado que las moléculas de unión que se describen en la presente tienen mucha utilidad en el direccionamiento hacia las células cancerosas y, por lo tanto, se pueden usar en la terapia de tipos de cáncer que expresan tanto TRAILR2 como CDH3. Los

métodos para identificar si un tumor particular expresa TRAILR2 y CDH3 son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar inmunohistoquímica para determinar si el tejido tumoral expresa TRAILR2 y CDH3 (por ejemplo, usando las moléculas de anticuerpo anti-TRAILR2 y/o CDH3 que se describen en la presente) y, por lo tanto, esto sería adecuado para el tratamiento con la molécula de unión de la invención.

Las moléculas de unión de la invención se pueden usar en regímenes terapéuticos en el contexto de los tratamientos de primera línea, segunda línea o cualquier línea adicional y tratamientos de mantenimiento.

En otro aspecto, se usa una molécula de unión de la invención en combinación con un dispositivo útil para administrar la molécula de unión, tal como una jeringa, una lapicera inyectora, una microbomba u otro dispositivo. En otro aspecto, la molécula de unión de la invención se incluye en un kit de piezas, que también incluye, por ejemplo, un prospecto con instrucciones para el uso de la molécula de unión.

La presente invención también comprende lo siguiente:

1. Una molécula de unión que comprende

(a) por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica al receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2), y

(b) por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a cadherina-3 (CDH3), en donde dicho por lo menos un sitio de unión al antígeno se une de manera específica a CDH3 se selecciona del grupo que consiste en:

i. un sitio de unión al antígeno que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:3 (CDR1), SEQ ID NO:4 (CDR2) y SEQ ID NO:5 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3);

ii. un sitio de unión al antígeno que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:17 (CDR1), SEQ ID NO:18 (CDR2) y SEQ ID NO:19 (CDR3);

iii. un sitio de unión al antígeno que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:23 (CDR1), SEQ ID NO:24 (CDR2) y SEQ ID NO:25 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:27 (CDR1), SEQ ID NO:28 (CDR2) y SEQ ID NO:29 (CDR3); y

iv. un sitio de unión al antígeno que comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:33 (CDR1), SEQ ID NO:34 (CDR2) y SEQ ID NO:35 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) y SEQ ID NO:39 (CDR3).

2. La molécula de unión del ítem 1, en donde el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a TRAILR2 comprende las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:73 (CDR1), SEQ ID NO:74 (CDR2) y SEQ ID NO:75 (CDR3)

y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:77 (CDR1), SEQ ID NO:78 (CDR2) y SEQ ID NO:79 (CDR3).

3. La molécula de unión del ítem 1 o 2, en donde el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 es una molécula de inmunoglobulina (Ig) y el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a TRAILR2 comprende uno o más scFv.

4. La molécula de unión del ítem 3, en donde el uno o más scFv tienen una orientación VL-VH desde el extremo N al C terminal.

5. La molécula de unión del ítem 3 o 4, en donde el uno o más scFv están fusionados al extremo C terminal de la molécula de Ig, preferiblemente en donde un primer scFv está fusionado a una primera cadena pesada y un segundo scFv está fusionado a la segunda cadena pesada de la molécula de Ig, respectivamente.

6. La molécula de unión de cualquiera de los ítems 3 a 5, en donde el uno o más scFv están cada uno fusionado a la molécula de Ig mediante un conector peptídico, preferiblemente un conector peptídico que tiene una longitud de aproximadamente 4 a 20 aminoácidos.

7. La molécula de unión de cualquiera de los ítems 3 a 6, en donde la molécula de Ig es IgG.

8. La molécula de unión de cualquiera de los ítems 1 a 7, en donde el sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CDH3 se selecciona del grupo que consiste en:

i. un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y un dominio variable de cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6;

ii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16;

iii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26; y

iv. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:36.

9. La molécula de unión de cualquiera de los ítems 1 a 8, que comprende:

i. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:80 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81;

ii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83;

iii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85; o

iv. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87.

10. La molécula de unión de cualquiera de los ítems 1 a 9, en donde el por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a

TRAILR2 es un sitio de unión al antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:72 y un dominio variable de cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76.

11. La molécula de unión del ítem 10, que comprende

i. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81;

ii. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83;

iii. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:21 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85; o

iv. una cadena pesada modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87.

12. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a CDH3, que comprende:

i. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:3 (CDR1), SEQ ID NO:4 (CDR2) y SEQ ID NO:5 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3);

ii. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:17 (CDR1), SEQ ID NO:18 (CDR2) y SEQ ID NO:19 (CDR3);

iii. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:23 (CDR1), SEQ ID NO:24 (CDR2) y SEQ ID NO:25 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:27 (CDR1), SEQ ID NO:28 (CDR2) y SEQ ID NO:29 (CDR3);

iv. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:33 (CDR1), SEQ ID NO:34 (CDR2) y SEQ ID NO:35 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:37 (CDR1), SEQ ID NO:38 (CDR2) y SEQ ID NO:39 (CDR3)

v. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:43 (CDR1), SEQ ID NO:44 (CDR2) y SEQ ID NO:45 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:47 (CDR1), SEQ ID NO:48 (CDR2) y SEQ ID NO:49 (CDR3);

vi. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:53 (CDR1), SEQ ID NO:54 (CDR2) y SEQ ID NO:55 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:57 (CDR1), SEQ ID NO:58 (CDR2) y SEQ ID NO:59 (CDR3); o

vii. las CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:63 (CDR1), SEQ ID NO:64 (CDR2) y SEQ ID NO:65 (CDR3) y las CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:67 (CDR1), SEQ ID NO:68 (CDR2) y SEQ ID NO:69 (CDR3).

13. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo del ítem 12, que comprende:

i. un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y un dominio variable de cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6;

ii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16;

iii. a VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26;

iv. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:36

v. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:46;

vi. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:52 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56; o

vii. un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:62 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:66.

14. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo del ítem 12 o 13, que comprende:

i. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:80 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:81;

ii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:83;

iii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85;

iv. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:87

v. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:88 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:89;

vi. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:90 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91; o

vii. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:93.

15. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de los ítems 12 a 14, que se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos quiméricos, humanizados, y de humano o fragmentos de anticuerpo, y scFv, fragmentos Fab, fragmentos de anticuerpo monovalentes y fragmentos F(ab')₂.

16. Un ácido nucleico aislado que codifica para la molécula de unión de cualquiera de los ítems 1 a 11 o el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de los ítems 12 a 15.

17. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico del ítem 16.

18. El vector del ítem 17, en donde dicho vector es un plásmido.

19. El vector del ítem 17, en donde dicho vector es un vector viral.

20. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de cualquiera de los ítems 17 a 19.

21. Un método para elaborar la molécula de unión de cualquiera de los ítems 1 a 11 o el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de los ítems 12 a 15 que comprende

i. cultivar la célula huésped del ítem 20 en condiciones que permiten la expresión de la molécula, y

ii. recuperar la molécula, y opcionalmente

iii. purificar y/o modificar y/o formular de manera adicional a la molécula.

22. La molécula de unión de cualquiera de los ítems de 1 a 11, para usar en medicina.

23. La molécula de unión de cualquiera de los ítems 1 a 11, para usar en el tratamiento de cáncer.

24. La molécula de unión para usar de acuerdo con el ítem 23, en donde el cáncer es cáncer de páncreas, cáncer de pulmón o cáncer de cabeza y cuello.

25. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión de cualquiera de los ítems 1 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

26. La composición farmacéutica de acuerdo con el ítem 25, que se liofiliza, se estabiliza y/o formular para la administración mediante inyección.

27. Una molécula de unión biespecífica que comprende por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica al receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF 2 (TRAILR2) y por lo menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica al dominio EC1 de cadherina-3 (CDH3).

Las características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de los siguientes ejemplos más detallados que ilustran, a modo de ejemplo, los principios de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: prevalencia tanto de CDH3 como de TRAILR2 en indicaciones de tumor seleccionadas

La inmunohistoquímica (IHC) para TRAILR2 y CDH3 se llevó a cabo de la siguiente manera:

se prepararon secciones de dos μm de espesor de cada bloque de FFPE en un micrótomó, se colocaron en portaobjetos de vidrio y se desparafinaron. Las secciones de CDH3 se tiñeron con el anticuerpo primario Abcam #ab242060, monoclonal de conejo (1:50 en diluyente con caseína, Roche #760-219) en una plataforma automática Ventana Discovery Ultra usando el programa #183. La IHC para DR5 se hizo usando el programa de Ventana Discovery nr. 148 con el siguiente anticuerpo: anti-DR5 de conejo (Cell Signalling #69400S Lote:1; 1:50 en diluyente Discovery Antibody (Roche # 760-108). Después de la tinción automática, se lavaron los portaobjetos con agua destilada en un detergente suave, luego se enjuagaron exhaustivamente con agua destilada, se colocaron en un baño de etanol al 90% durante 1 minuto, luego se pasaron por tres baños de etanol al 100% durante 1 minuto, luego se pasaron por dos baños de xileno durante 30 segundos, y finalmente se cubrieron con medio de montaje. Los portaobjetos se escanearon (3D Histech) y se enviaron para su análisis.

La expresión de CDH3 se ensayó por IHC en tejido no neoplásico (n=40) que incluyó hígado y no se encontró expresión de CDH3 (datos no mostrados). Se detectó la coexpresión de TRAILR2 y CDH3 mediante la medida de los niveles de ARNm en varias indicaciones tales como cáncer de páncreas (PAC), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de mama triple negativo, y en cáncer urotelial de vejiga, de ovario, endometrial y cervical (TCGA), como se muestra más adelante para algunas de estas indicaciones en la Tabla 2.

Tabla 2: prevalencia de expresión de *CDH3* y *TRAILR2* en diferentes indicaciones (datos de TCGA)

Base de datos TCGA		Número de casos (TPM ≥30)			Proporción (%) (TPM ≥30)		
Indicación	Casos informativos (n)	TRAILR2	CDH3	TR2/CDH3	TRAILR2	CDH3	TR2/CDH3
HNSCC	504	396	496	391	78,57	98,41	77,58
Adenocarcinoma pancreático	179	156	118	115	87,15	65,92	64,25
Adenocarcinoma cel. escamosas pulmón	500	371	452	349	74,20	90,40	69,80
Adenocarcinoma de pulmón	506	441	307	283	87,15	60,67	55,93
Carcinoma de ovario	381	74	194	50	19,42	50,92	13,12
Carcinoma endometrial	542	382	389	290	70,48	71,77	53,51
Cáncer mama triple negativo	177	82	141	70	46,33	79,66	39,55
Cáncer colorrectal	612	545	484	437	89,05	79,85	71,41

El número total de casos informativos, y el número y la proporción (en %) de casos que muestran las características de interés (expresión de ARNm, TPM ≥ 30) están indicados para cada tipo de cáncer. TPM: transcriptos por millón de lecturas, TR2/CDH3: casos doble positivos para TRAILR2 y CDH3, TCGA: The Cancer Genome Atlas. HNSCC: carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

Por ejemplo, en las **Figuras 2 A y B** se muestra la expresión de la proteína y la localización en membrana en correlación con la expresión del ARNm para TRAILR2 y CDH3 en carcinoma colorrectal.

En la **Figura 2C** se muestran imágenes de IHC representativas para CDH3 y TRAILR2 en secciones de tejido de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello así como en carcinoma de células escamosas de esófago.

Ejemplo 2: diseño y generación de moléculas de unión que reconocen la cadherina 3 (CDH3) humana y el receptor TRAIL humano 2 (TRAILR2)

En el presente estudio, se desarrollaron moléculas de unión que se unen a CDH3 y a TRAILR2 y que inducen la apoptosis en las células cancerosas que expresan tanto CDH3 como TRAILR2. El diseño molecular comprende un anticuerpo IgG que tiene especificidad para CDH3 y scFv con especificidad para TRAILR2, acoplados al extremo C terminal de la cadena pesada. La molécula biespecífica contiene secuencias peptídicas flexibles entre los dominios variable

de cadena pesada (VH) y variable de cadena liviana (VL) del scFv, y los dominios scFv están conectados con anticuerpo IgG a través de una serie de conectores.

Las moléculas de unión son biespecíficas y tetravalentes. En la Figura 3 se muestra un esquema del diseño. Se representa un ejemplo de una molécula de unión de la invención que comprende (i) una molécula de Ig que se une de manera específica a CDH3, que comprende dos cadenas pesadas y dos livianas, y (ii) dos moléculas de scFv que se unen de manera específica a TRAILR2. El extremo N terminal de un scFv está fusionado al extremo C terminal de cada cadena pesada de la molécula de Ig, formando de esta manera una molécula similar a anticuerpo simétrica, biespecífica y tetravalente.

Los siguientes ejemplos explican los métodos que se usaron para generar las moléculas biespecíficas que se unen a CDH3 y a TRAILR2 así como para evaluar la actividad biológica de estas moléculas.

2.1 Preparación de dominios de unión que reconocen a CDH3 y TRAILR2 usando recuperación de genes V de alto rendimiento a partir de hibridomas y células B individuales en cultivo

Para preparar las moléculas biespecíficas que se unen al CDH3 y TRAILR2 humanos, es necesario obtener los dominios variables que se unen a los antígenos diana individuales (anti-CDH3 y anti-TRAILR2). Para conseguir esto, se cultivaron *in vitro* hibridomas clonales o células B individuales derivadas de ratones humanizados AlivaMab inmunizados con CDH3 o TRAILR2 (Ablexis, San Francisco, Calif., EE.UU.: AlivaMab transgenic mouse platform with human immunoglobulin loci). Se seleccionaron los sobrenadantes de acuerdo con la reactividad contra CDH3 o TRAILR2 humanos recombinantes, mediante

AlphaLISA (PerkinElmer, Waltham, Mass., EE.UU.), y contra la unión a células GP2d, por citometría de flujo.

Luego se amplificaron los genes VH y VL de las inmunoglobulinas (Ig) a partir de los clones identificados como positivos. Para aislar el ARN de los hibridomas, se centrifugaron aproximadamente 2×10^6 células de los clones individuales y se usaron como material fuente. Para las células B individuales, se usaron entre 100 y 500 células expandidas a partir de las células B aisladas individuales como material fuente. Se aisló el ARN usando el kit RNeasy Plus (Qiagen, Hilden, Alemania). Luego se sintetizó el ADNc usando el kit Smarter cDNA synthesis (Clontech, Mount View, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para facilitar la síntesis del ADNc, se usó un oligodT como cebador de la transcripción reversa de todos los ARN mensajeros seguido por una “protección del extremo 5’ (del inglés *capping*)” con un oligonucleótido Smarter IIA. La subsiguiente amplificación de los fragmentos de VH y VL se llevó a cabo usando una amplificación de PCR en dos pasos usando cebadores 5’ contra el capuchón Smarter IIA y cebadores 3’ contra regiones consenso de CH1. En resumen, cada reacción de PCR de 50 μ l consiste en mezclas de 20 μ M de los cebadores directo y reverso, 25 μ l de premezcla de para ADN polimerasa PrimeStar Max (Clontech), 2 μ l de ADNc no purificado, y 21 μ l de agua bidestilada. El programa de ciclado comienza a 94° C durante 3 min, seguido por 35 ciclos (94° C durante 30 segundos, 50° C durante 1 min, 68° C durante 1 min), y síntesis de extremos a 72° C durante 7 min. La segunda ronda de la PCR se llevó a cabo con cebadores de 2da ronda para VL y VH que contenían extensiones complementarias de 15 pb que “se solapaban” con las respectivas regiones de

su respectivo vector pTT5 madre (VH y VL). La segunda ronda de PCR se llevó a cabo con el siguiente programa: 94° C durante 3 min; 35 ciclos (94° C durante 30 segundos, 50° C durante 1 min, 68° C durante 1 min), y síntesis de extremos a 72° C durante 7 min.

Se usó el In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech, EE.UU.) para el clonado direccional del gen VL en un vector pTT5 hulgK y del gen VH en un vector pTT5 hulgG1KO. Para facilitar el clonado con In-Fusion® HD Cloning, se purificaron los productos de la PCR y se trataron con Cloning Enhancer antes del In-Fusion HD Cloning. El clonado y la transformación se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante (Clontech, EE.UU.). Los ADN de las minipreparaciones se sometieron a secuenciación de Sanger para confirmar la obtención de los fragmentos completos de los genes V.

Usando esta metodología, se preparó un gran número de pares de genes VH y VL de Ig que codificaban para los dominios de unión con especificidad para CDH3.

2.2 Selección confirmatoria de los anticuerpos recombinantes

Se produjeron los anticuerpos recombinantes por transfección transitoria de las células CHO-E37 con los correspondientes plásmidos que codificaban para la cadena pesada y la cadena liviana. Se ensayaron los sobrenadantes que contenían los anticuerpos recombinantes expresados por citometría de flujo para ver la unión a las líneas celulares que expresan CDH3 human o de mono cinomolgo. En resumen, se incubaron las células con los sobrenadantes recombinantes, se lavaron y se detectaron los mAb unidos de los sobrenadantes con anti-IgG humana-APC (Jackson ImmunoResearch 109-136-098). Se calcularon las proporciones de señal a ruido de fondo (S/B) mediante la división

de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de la muestra por la del control de isotipo (regiones variables contra una proteína no relacionada y esqueletos de regiones constantes diferentes). Se seleccionaron los clones de interés para un formateo multiespecífico. Se generaron proteínas de unión multiespecífica y se evaluaron además mediante una selección mecánica y funcional (tal como unión a células, citotoxicidad y ensayos de activación de caspasas).

2.3 Construcción de moléculas biespecíficas que se unen a CDH3 y a TRAILR2

Para construir el segmento génico que codifica para el scFv anti-TRAILR2, se unieron los pares de genes VL y VH que codifican para los dominios variables de unión a TRAILR2 (SEQ ID NO:76 y SEQ ID NO:72, respectivamente) mediante un segmento génico que codifica para un conector flexible con una secuencia peptídica GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:232). Los segmentos génicos resultantes que codifican para scFv se clonaron a su vez en marco al extremo 3' de un gen que codifica para la cadena pesada de un anticuerpo IgG humano. Estos segmentos codificantes se sintetizaron mediante métodos de PCR solapante y se clonaron en el vector de expresión pTT5. Los pares de genes VL y VH que codifican para los dominios variables de unión a CDH3 que se prepararon en el Ejemplo 2.1 se llevaron luego a un formato biespecífico como se ilustra en la **Figura 3**. Los genes VH se clonaron en el vector de expresión pTT5 como fusión in marco en el extremo 5' de un gen que codifica para Igy humana. Se clonó un gen que codifica para un scFv de unión a TRAILR2 en marco en el extremo 3' del mismo segmento codificante de Igy. De la misma forma, se clonaron los genes VL en el vector de

expresión pTT5 como fusión en marco con un gen que codifica para la cadena liviana kappa de IgG humana.

Los pares de genes VL y VH que codifican para los dominios variables de unión a CDH3 que se prepararon en el Ejemplo 2.1 se usaron entonces para preparar moléculas de anticuerpo (moléculas de anticuerpo de longitud completa que comprenden dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas) que se unen de manera específica a CDH3 (y se llaman CDH3v1, CDH3v2, CDH3v3, CDH3v4, CDH3v5, CDH3v6 o CDH3v7, ver las Tablas 11-17) usando métodos conocidos en el arte, y se usaron para detectar/marcar las células o como anticuerpos control en los ejemplos que se describen más adelante. Luego se conectaron los scFv anti-TRAILR2 (Tabla 10) a través del conector que se describió anteriormente, al extremo C terminal de cada cadena pesada de los anticuerpos anti-CDH3, generando así las moléculas de unión anti-CDH3/TRAILR2 biespecíficas y tetravalentes (Tablas 3-9).

Cada vector de expresión contiene elementos promotores eucariotas para el gen que codifica para las cadenas, la secuencia señal y la cadena pesada o la cadena liviana, un casete de expresión para un gen marcador de selección de procariotas tal como ampicilina, y un origen de replicación. Estos plásmidos de ADN se propagaron en colonias de *E. coli* resistentes a ampicilina y se purificaron.

2.4 Expresión y purificación de moléculas tetravalentes biespecíficas que reconocen a TRAILR2 humano y a CDH3 humano

Se produjeron moléculas biespecíficas que se unen a CDH3 y a TRAILR2 por transfección transitoria de células CHO-E con los vectores pTT5 que portan los genes que codifican para las cadenas anti-CDH3/TRAILR2. Las células CHO-

Las células CHO-E transfectadas, creciendo en suspensión en medio libre de suero, se cultivaron en recipientes agitados a 140 rpm, 37°C y 5% de CO₂ y se mantuvieron en condiciones de crecimiento exponencial. El día de la transfección, se transfectaron químicamente las células con 1 mg de plásmido para la cadena liviana y 0,5 mg de plásmido para la cadena pesada (proporción en masa 1:3). Luego se sembraron las células CHO-E a entre 1 y 2x10⁶ células/ml en 1 L de medio de expresión para CHO Gibco® FreeStyle™ (LifeTechnologies, NY, EE.UU.). Luego se incubaron las células bajo agitación orbital entre 10 y 12 días un solo cambio de medio con 200 ml de solución de alimentación comercial para permitir la expresión de las proteínas. Se determinaron los títulos de los anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo celular usando un instrumento Octet® (Pall 30 ForteBio, CA, EE.UU.) y puntas biosensoras protA de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las moléculas de unión o los anticuerpos anti-CDH3/TRAILR2 recombinantes se purificaron del sobrenadante de cultivo mediante un proceso de dos pasos: un primer paso de purificación con cromatografía de afinidad con Proteína A usando una columna MabSelect™ (GE Healthcare) seguido por un segundo paso de purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico usando una columna Poros 50 HS (Applied Biosystems, Carlsbad, Calif., EE.UU.). El material purificado mediante dos pasos se almacenó en la solución amortiguadora final de acetato de sodio 50 mM y NaCl 100 mM, pH 5,0. Se evaluaron la pureza y el grado de heterogeneidad de las muestras por espectrometría de masas, cromatografía analítica de exclusión molecular y ultracentrifugación analítica. Se confirmó que las muestras tuvieran un contenido

de monómero $\geq 90\%$ y que tuvieran $< 10\%$ de impurezas antes de la prueba funcional.

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de la molécula de unión biespecífica

anti-CDH3/TRAILR2v7

SEQ ID NO	Descripción	CDH3/TR2v7
1	CDH3 de cadena pesada modificada incl. scFv anti- TRAILR2	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS<u>SSYYW</u> <u>SWIRQPPGKGLDWIGYIYYSRTTNYNPSLKSRVTI</u> SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR<u>ARNGIDA</u> <u>FDI</u>WGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP <u>GGGSGGSS</u>ELTQDPAVSVALGQTVRITC<u>QGDSL</u> <u>RSYYAS</u>WYQQKPGQAPVLVIY<u>GKNNRPS</u>GIPDRF SGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC<u>NSRDSSGN</u> <u>HVV</u>FGGGTKLTVL<u>GGGGSGGGGSGGGGSGGGG</u> <u>SEVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFDY</u> <u>GMS</u>WVRQAPGKGLEWVS<u>GINWNGGSTGYADSV</u> <u>KGR</u>VTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<u>I</u> <u>LGAGRGWYFDL</u>WGKGTTVTVSS

2	CDH3 VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <u>SSYYW</u> <u>SWIRQPPGKGLDWIGYIYYSRRTTNYNPSLKS</u> RVTI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR <u>ARNGIDA</u> <u>FDI</u> WGQGTMTVSS
3	HCDR1	SSYYWS
4	HCDR2	YIYYSRRTTNYNPSLKS
5	HCDR3	ARNGIDAFDI
6	CDH3 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR <u>SSQSLLHSYGY</u> <u>NYLD</u> WYLQKPGQSPQLLIY <u>LGSNRAS</u> GVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAADVGYYC <u>MQALQTPLTF</u> GGGTKVEIK
7	LCDR1	RSSQSLLHSYGYNYLD
8	LCDR2	LGSNRAS
9	LCDR3	MQALQTPLT
81	Secuencia de la cadena liviana	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR <u>SSQSLLHSYGY</u> <u>NYLD</u> WYLQKPGQSPQLLIY <u>LGSNRAS</u> GVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAADVGYYC <u>MQALQTPLTF</u> GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
71	scFv anti- TRAILR2	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGD</u> SLRSYYASW YQQKPGQAPVLIY <u>GKNNRPS</u> GIPDRFSGSSSGN TASLTITGAQAEDADYYC <u>NSRDSSGNHVV</u> FGGG TKLTVLGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSEVQLVQ

		SGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFD<u>DYGMS</u>WVRQ APGKGLEWVS<u>GINWNGGSTGYADSVKG</u>RVTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<u>ILGAGRGW</u> <u>YFDL</u>WGKGTTVTVSS
--	--	--

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de la molécula de unión biespecífica

anti-CDH3/TRAILR2v1

SEQ ID NO	Descripción	CDH3/TR2v1
11	Cadena pesada modificada incl. scFv anti-TRAILR2	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT<u>SYWI</u> <u>G</u>WVRQMPGKGLEWMG<u>IIYPGDS</u><u>SDTRYSPSFQ</u><u>GQ</u> VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR<u>H</u><u>SFF</u> <u>DY</u>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GSGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITC<u>QGDSLRS</u> <u>YYAS</u>WYQQKPGQAPVLVIY<u>GKNNRPS</u>GIPDRFSG SSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC<u>NSRDSSGNHV</u> <u>V</u>FGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFD<u>DYGM</u> <u>S</u>WVRQAPGKGLEWVS<u>GINWNGGSTGYADSVKG</u> RVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<u>ILG</u> <u>AGRGWYFDL</u>WGKGTTVTVSS

12	CDH3 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT <u>SYWI</u> <u>GWVRQMPGKGLEWMGI</u> <u>IYPGDS DTRYSPSFQGQ</u> VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR <u>HSFF</u> <u>DYWGQG</u> TLVTSS
13	HCDR1	SYWIG
14	HCDR2	IYPGDS DTRYSPSFQG
15	HCDR3	HSFFDY
16	CDH3 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSIYA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYSSSPRT</u> FGQGTK VEIK
17	LCDR1	RASQSVSSIYA
18	LCDR2	GASSRAT
19	LCDR3	QQYSSSPRT
83	Secuencia de la cadena liviana	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSIYA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYSSSPRT</u> FGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
71	scFv anti- TRAILR2	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGDSLRSYYASW</u> YQQKPGQAPVLVIY <u>GKNNRPS</u> GIPDRFSGSSSGN TASLTITGAQAEDADYYC <u>NSRDSSGNHVV</u> FGGG TKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQ

		SGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFD<u>DYGMS</u>WVRQ APGKGLEWVS<u>GINWNGGSTGYADSVKG</u>RVTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<u>ILGAGRGW</u> <u>YFDL</u>WGKGTTVTVSS
--	--	--

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de la molécula de unión biespecífica

anti-CDH3/TRAILR2v2

SEQ ID NO	Descripción	CDH3/TR2v2
21	Cadena pesada modificada incl. scFv anti-TRAILR2	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS<u>NYYW</u> <u>SWIRQPPGKGLEWIGYMYYSGITNYNPSLKS</u>RVTI SVDTSKNQFSLKLNSVTTADTAVYYCAR<u>ERNGIDG</u> <u>MDV</u>WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGSGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITC<u>QGDSL</u> <u>RSYYAS</u>WYQQKPGQAPVLVIY<u>GKNNRPS</u>GIPDRF SGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC<u>NSRDSSGN</u> <u>HVV</u>FGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SEVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFD<u>DY</u> <u>GMS</u>WVRQAPGKGLEWVS<u>GINWNGGSTGYADSV</u> <u>KGR</u>VTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<u>I</u> <u>LGAGRGWYFDL</u>WGKGTTVTVSS

22	CDH3 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS <u>NYYW</u> <u>SWIRQPPGKGLEWIGYMYYSGITNYNPSLKS</u> RVTI SVDTSKNQFSLKLNSVTTADTAVYYCAR <u>ERNGIDG</u> <u>MDVWGQGTTVTVSS</u>
23	HCDR1	NYYWS
24	HCDR2	YMYYSGITNYNPSLKS
25	HCDR3	ERNGIDGMDV
26	CDH3 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR <u>RSSQSLLSYGY</u> <u>NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS</u> GVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDFGIYYC <u>MQALQTPIT</u> FG QGTRLEIK
27	LCDR1	RSSQSLLSYGYNYLD
28	LCDR2	LGSNRAS
29	LCDR3	MQALQTPIT
85	Secuencia de la cadena liviana	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR <u>RSSQSLLSYGY</u> <u>NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS</u> GVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDFGIYYC <u>MQALQTPIT</u> FG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
71	scFv anti- TRAILR2	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGDSLRSYYASW</u> YQQKPGQAPVLVIY <u>GKNNRPS</u> GIPDRFSGSSSGN TASLTITGAQAEDADYYC <u>NSRDSSGNHVV</u> FGGG TKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQ

		SGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFD <u>DYGMS</u> WVRQ APGKGLEWVS <u>GINWNGGSTGYADSVKG</u> RVTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>ILGAGRGW</u> <u>YFDL</u> WGKGTTVTVSS
--	--	---

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos de la molécula de unión biespecífica

anti-CDH3/TRAILR2v3

SEQ ID NO	Descripción	CDH3/TR2v3
31	Cadena pesada modificada incl. scFv anti-TRAILR2	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS<u>SGYYW</u> <u>SWIRQSPGKGLEWIGYIYY</u><u>SANTNYP</u><u>SLKSRVTI</u> SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCSR<u>GGSGSY</u> <u>WAFDI</u>WGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGSGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITC<u>QGDS</u> <u>LSYYAS</u>WYQQKPGQAPVLVIY<u>GKNRPS</u>GIPDR FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC<u>NSRDSSG</u> <u>NHVV</u>FGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSEVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFD<u>D</u> <u>YGMS</u>WVRQAPGKGLEWVS<u>GINWNGGSTGYADS</u> <u>VKGR</u>VTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>KILGAGRGWYFDL</u>WGKGTTVTVSS

32	CDH3 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS <u>GYYW</u> <u>SWIRQSPGKGLEWIGYIYY</u> <u>SANTNYNPSLKS</u> RVTI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCSR <u>GGSGSY</u> <u>WAFDI</u> WGQGTMTVSS
33	HCDR1	GYYS
34	HCDR2	YIYY SANTNYNPSLKS
35	HCDR3	GGSGSYWAFDI
36	CDH3 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR <u>RSSQSLMYSYGY</u> <u>NYLD</u> WYLQKPGQSPQLLIY <u>LGSNRAS</u> GVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYC <u>MQALQTPPT</u> FG QGTVKVEIK
37	LCDR1	RSSQSLMYSYGYNYLD
38	LCDR2	LGSNRAS
39	LCDR3	MQALQTPPT
87	Secuencia de la cadena liviana	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR <u>RSSQSLMYSYGY</u> <u>NYLD</u> WYLQKPGQSPQLLIY <u>LGSNRAS</u> GVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYC <u>MQALQTPPT</u> FG QGTVKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
71	TrailR2 scFv	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGDLSRSYYASW</u> YQQKPGQAPVLIY <u>GKNNRPS</u> GIPDRFSGSSSGN TASLTITGAQAEDVYCYC <u>NSRDSSGNHVV</u> FGGG TKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQ

		SGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFD<u>DYGMS</u>WVRQ APGKGLEWVS<u>GINWNGGSTGYADSVKG</u>RVTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<u>ILGAGR</u>GW <u>YFDL</u>WGKGTTVTVSS
--	--	--

Tabla 7. Secuencias de aminoácidos de la molécula de unión biespecífica

anti-CDH3/TRAILR2v4

SEQ ID NO	Descripción	CDH3/TR2v4
41	Cadena pesada modificada incl. scFv anti-TRAILR2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS<u>GY</u> <u>W</u>SWIRQPAGKGLEWIG<u>RIYTS</u><u>GNTIYNPSLKS</u><u>R</u> VTMSVDTSKNQFSLRLTSVTAADTAVYYCARG<u>N</u> <u>PLATYFGY</u>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSSSELTQDPA VSVALGQTVRITC<u>QGD</u><u>SLRSYYAS</u>WYQQKPGQ APVLVIY<u>GKNNRPS</u>GIPDRFSGSSSGNTASLTIT GAQAEDEADYYC<u>NSRDSSGNHVV</u>FGGGTKLTV LGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGG GVERPGGSLRLSCAASGFTFD<u>DYGMS</u>WVRQAP GKGLEWVS<u>GINWNGGSTGYADSVKGR</u>VTISRD

		NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>ILGAGRGW</u> <u>YFDL</u> WGKGTTVTVSS
42	CDH3 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS <u>GY</u> <u>W</u> SWIRQPAGKGLEWIG <u>RIYTS</u> GNTIYN <u>PSLKS</u> R VTMSVDTSKNQFSLRLTSVTAADTAVYYCARG <u>N</u> <u>PLATYFGY</u> WGQGTTLVTVSS
43	HCDR1	GYYS
44	HCDR2	RIYTS GNTIYNPSLKS
45	HCDR3	GNPLATYFGY
46	CDH3 VL	DIEMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>C</u> <u>KSSQSVLYSSN</u> <u>NKNYLA</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>WASTRES</u> GVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QQYYS</u> <u>TMYT</u> FGQGTKLEIK
47	LCDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA
48	LCDR2	WASTRES
49	LCDR3	QQYYSTMYT
89	Secuencia de la cadena liviana	DIEMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>C</u> <u>KSSQSVLYSSN</u> <u>NKNYLA</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>WASTRES</u> GVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QQYYS</u> <u>TMYT</u> FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
71	scFv anti- TRAILR2	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGDSLRSYYAS</u> WYQQKPGQAPVLVIY <u>GKNNRPS</u> GIPDRFSGSSS

		GNTASLTITGAQAEDEADYYC <u>NSRDSSGNHVVF</u> GGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFD <u>DYGM</u> <u>S</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>GINWNGGSTGYADSVK</u> <u>G</u> RVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>I</u> <u>LGAGRGWYFDL</u> WGKGTTVTVSS
--	--	---

Tabla 8. Secuencias de aminoácidos de la molécula de unión biespecífica

anti-CDH3/TRAILR2v5

SEQ ID NO	Descripción	CDH3/TR2v5
51	Cadena pesada modificada incl. scFv anti-TRAILR2	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS<u>SSYYW</u> <u>SWFR</u>QPAGKGLEWIG<u>RIYSSGSTNYNPSLKS</u>RV MSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR<u>GMGVT</u> <u>GLFDY</u>WGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGSGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITC<u>QGDS</u> <u>LSYYAS</u>WYQQKPGQAPVLVIY<u>GKNNRPS</u>GIPDR FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC<u>NSRDSSG</u> <u>NHVV</u>FGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVQSGGGVERP GGSLRLSCAASGFTFD<u>D</u> <u>YGMS</u>WVRQAPGKGLEWVS<u>GINWNGGSTGYADS</u> <u>VKGR</u>VTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>KILGAGRGWYFDL</u>WGKGTTVTVSS

52	CDH3 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS <u>SSYYW</u> <u>SWFRQPAGKGLEWIGRIYSSGSTNYNPSLKS</u> RVT MSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARG <u>GMGVT</u> <u>GLFDY</u> WGQGTLLVTVSS
53	HCDR1	SYYS
54	HCDR2	RIYSSGSTNYNPSLKS
55	HCDR3	GMGVTGLFDY
56	CDH3 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK <u>KSSQSVLYSSNN</u> <u>KNYLAWY</u> QQKPGQPPKLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QQYYSTMY</u> <u>TFGQGT</u> KLEIK
57	LCDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA
58	LCDR2	WASTRES
59	LCDR3	QQYYSTMYT
91	Secuencia de la cadena liviana	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK <u>KSSQSVLYSSNN</u> <u>KNYLAWY</u> QQKPGQPPKLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QQYYSTMY</u> <u>TFGQGT</u> KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
71	scFv anti- TRAILR2	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGDSLRSYYASW</u> YQQKPGQAPVLIY <u>GKNNRPS</u> GIPDRFSGSSSGN TASLTITGAQAEDVAVYYC <u>NSRDSSGNHVV</u> FGGG TKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQ

		SGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFD<u>DYGMS</u>WVRQ APGKGLEWVS<u>GINWNGGSTGYADSVKG</u>RVTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<u>ILGAGR</u>GW <u>YFDL</u>WGKGTTVTVSS
--	--	--

Tabla 9. Secuencias de aminoácidos de la molécula de unión biespecífica

anti-CDH3/TRAILR2v6

SEQ ID NO	Descripción	CDH3/TR2v6
61	Cadena pesada modificada incl. scFv anti- TRAILR2	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIN<u>NIYYW</u> <u>TI</u>WIRQPAGKGLEWIG<u>RIYSSGSTNYTPSLKSRVT</u> MSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARE<u>EGYND</u> <u>GYGYFDH</u>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGSGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGDSLRSYYAS</u>WYQQKPGQAPVLVIY<u>GKNNRPS</u> GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC<u>NSR</u> <u>DSSGNHVV</u>FGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGF TFD<u>DYGMS</u>WVRQAPGKGLEWVS<u>GINWNGGSTG</u> <u>YADSVKGR</u>VTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCAK<u>LGAGRGWYFDL</u>WGKGTTVTVSS

62	CDH3 VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIN <u>NYYW</u> <u>TWIR</u> QPAGKGLEWIG <u>RIYSSGSTNYTPSLKS</u> RV MSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARE <u>EGYND</u> <u>GYGYFDH</u> WGQGLTVTVSS
63	HCDR1	NYYWT
64	HCDR2	RIYSSGSTNYTPSLKS
65	HCDR3	EGYNDGYGYFDH
66	CDH3 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK <u>KSSQSVLYSSKN</u> <u>KNYLA</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QQYYSTFRT</u> FGQGTKVEIK
67	LCDR1	KSSQSVLYSSKNKNYLA
68	LCDR2	WASTRES
69	LCDR3	QQYYSTFRT
93	Secuencia de la cadena liviana	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK <u>KSSQSVLYSSKN</u> <u>KNYLA</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QQYYSTFRT</u> FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
71	scFv anti- TRAILR2	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGD</u> SLRSYYASW YQQKPGQAPVLIY <u>GKNNRPS</u> GIPDRFSGSSSGN TASLTITGAQAEDVAVYYC <u>NSRDSSGNHVV</u> FGGG TKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQ

		SGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFD<u>DYGMS</u>WVRQ APGKGLEWVS<u>GINWNGGSTGYADSVKG</u>RVTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<u>ILGAGRGW</u> <u>YFDL</u>WGKGTTVTVSS
--	--	--

Tabla 10. Secuencias de aminoácidos del scFv anti-TRAILR2 usado en las moléculas biespecíficas de unión generadas en el Ejemplo 2.

SEQ ID NO	Descripción	
71	scFv anti-TRAILR2	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGDSLRSYYAS</u> WYQQKPGQAPVLVIY <u>GKNNRPS</u> GIPDRFSGSSS GNTASLTITGAQAEDEADYYC <u>NSRDSSGNHVV</u> F GGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFD <u>DYGM</u> <u>S</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>GINWNGGSTGYADSVK</u> <u>G</u> RVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>I</u> <u>LGAGRGWYFDL</u> WGKGTTTVTVSS
72	scFv anti-TRAILR2 VH	EVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFD <u>DY</u> <u>GMS</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>GINWNGGSTGYADS</u> <u>VKG</u> RVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK <u>ILGAGRGWYFDL</u> WGKGTTTVTVSS
73	scFv HCDR1	DYGMS
74	scFv HCDR2	GINWNGGSTGYADSVKG
75	scFv HCDR3	ILGAGRGWYFDL
76	scFv anti-TRAILR2 VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGDSLRSYYAS</u> WYQQKPGQAPVLVIY <u>GKNNRPS</u> GIPDRFSGSSS

		GNTASLTITGAQAEDEADYYC <u>NSRDSSGNHVVF</u> GGGTKLTVL
77	scFv LCDR1	QGDSLRSYYAS
78	scFv LCDR2	GKNNRPS
79	scFv LCDR3	NSRDSSGNHVV

Tabla 11. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CDH3 CDH3v7

SEQ ID NO	Descripción	CDH3v7
80	Secuencia de la cadena pesada	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS<u>SSYYW</u> <u>SWIRQPPGKGLDWIGYIYYSRTTNYNPSLKS</u>RVTI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR<u>ARNGIDA</u> <u>FDI</u>WGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
81	Secuencia de la cadena liviana	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR<u>SSQSLLHSYGY</u> <u>NYLD</u>WYLQKPGQSPQLLIY<u>LGSNRAS</u>GVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAADVGYYC<u>MQALQTP</u>LTFF GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

2	VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <u>SSYYW</u> <u>SWIRQPPGKGLDWIGYIYYSRRTTNYNPSLKS</u> RVTI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR <u>ARNGIDA</u> <u>FDI</u> WGQGTMTVSS
3	HCDR1	SYWWS
4	HCDR2	YIYYSRRTTNYNPSLKS
5	HCDR3	ARNGIDAFDI
6	VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR <u>RSSQSLLHSYGY</u> <u>NYLD</u> WYLQKPGQSPQLLIY <u>LGSNRAS</u> GVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAADVGYYC <u>MQALQTPLTF</u> GGGTKVEIK
7	LCDR1	RSSQSLLHSYGYNYLD
8	LCDR2	LGSNRAS
9	LCDR3	MQALQTPLT

Tabla 12. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CDH3 CDH3v1

SEQ ID NO	Descripción	CDH3v1
82	Secuencia de la cadena pesada	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT <u>SYWI</u> <u>GWVRQMPGKGLEWMGI</u> <u>IYPGDS</u> <u>SDTRYSPSFQ</u> <u>GQ</u> VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR <u>HSFF</u> <u>DY</u> WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
83	Secuencia de la cadena liviana	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSI</u> <u>LA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYSSSPRT</u> FGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
12	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT <u>SYWI</u> <u>GWVRQMPGKGLEWMGI</u> <u>IYPGDS</u> <u>SDTRYSPSFQ</u> <u>GQ</u>

		VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR <u>HSFF</u> <u>DYWGQGTLVTVSS</u>
13	HCDR1	SYWIG
14	HCDR2	IIYPGDS DTRYSPSFQG
15	HCDR3	HSFFDY
16	VL	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSC <u>RASQSVSSIYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYSSSPRT</u> FGQGTK VEIK
17	LCDR1	RASQSVSSIYLA
18	LCDR2	GASSRAT
19	LCDR3	QQYSSSPRT

Tabla 13. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CDH3 CDH3v2

SEQ ID NO	Descripción	CDH3v2
84	Secuencia de la cadena pesada	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS<u>NYYW</u> <u>SWIRQPPGKGLEWIGYMYYSGITNYNPSLKS</u>RVTI SVDTSKNQFSLKLNSVTTADTAVYYCAR<u>ERNIGIDG</u> <u>MDV</u>WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSP G
85	Secuencia de la cadena liviana	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR<u>SSQSLLHSYGY</u> <u>NYLD</u>WYLQKPGQSPQLLIY<u>LGSNRAS</u>GVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDFGIYYC<u>MQALQTPIT</u>FG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

22	VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <u>NYYW</u> <u>SWIRQPPGKGLEWIGYMYYSGITNYNPSLKS</u> RVTI SVDTSKNQFSLKLNSVTTADTAVYYCAR <u>ERNGIDG</u> <u>MDVWGQGTTVTVSS</u>
23	HCDR1	NYYWS
24	HCDR2	YMYYSGITNYNPSLKS
25	HCDR3	ERNGIDGMDV
26	VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR <u>RSSQSLLHSYGY</u> <u>NYLD</u> WYLQKPGQSPQLLIY <u>LGSNRAS</u> GVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDFGIYYCMQALQTPITFG QGTRLEIK
27	LCDR1	RSSQSLLHSYGYNYLD
28	LCDR2	LGSNRAS
29	LCDR3	MQALQTPIT

Tabla 14. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CDH3 CDH3v3

SEQ ID NO	Descripción	CDH3v3
86	Secuencia de la cadena pesada	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS<u>SGYY</u> <u>WS</u>WIRQSPGKGLEWIG<u>YIYYSANTNYNPSLKSR</u> VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCSR<u>GGS</u> <u>GSYWAFDI</u>WGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
87	Secuencia de la cadena liviana	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR<u>SSQSLMYSYG</u> <u>YNYLD</u>WYLQKPGQSPQLLIY<u>LGSNRAS</u>GVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYC<u>MQALQTPP</u> <u>I</u>FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

32	VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <u>GY</u> <u>W</u> SWIRQSPGKGLEWIG <u>YIYYSANTNYNPSLKSR</u> VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCSR <u>GS</u> <u>GSYWAFDI</u> WGQGTMTVSS
33	HCDR1	GYYS
34	HCDR2	YIYYSANTNYNPSLKS
35	HCDR3	GGSGSYWAFDI
36	VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR <u>SSQSLMYSYG</u> <u>YNYLD</u> WYLQKPGQSPQLLIY <u>LGSNRAS</u> GVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYC <u>MQALQTPP</u> <u>T</u> FGQGTKVEIK
37	LCDR1	RSSQSLMYSYGYNYLD
38	LCDR2	LGSNRAS
39	LCDR3	MQALQTPPT

Tabla 15. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CDH3 CDH3v4

SEQ ID NO	Descripción	CDH3v4
88	Secuencia de la cadena pesada	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS<u>GY</u> <u>W</u>SWIRQPAGKGLEWIG<u>RIYTS</u><u>GNTIYNPSL</u><u>KSR</u> VTMSVDTSKNQFSLRLTSVTAADTAVYYCARG<u>N</u> <u>PLATYFGY</u>WGQGT_{LVTVSS}ASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT_{SWNS}GALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV_{TV}PSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV_{VV} DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV_{FSC}SVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
89	Secuencia de la cadena liviana	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINC<u>KSSQSVLYSSN</u> <u>NKNYLA</u>WYQQKPGQPPKLLIY<u>WASTRES</u>GVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC<u>QQYY</u><u>S</u> <u>TMYT</u>FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

42	VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <u>GY</u> <u>W</u> SWIRQPAGKGLEWIG <u>RIY</u> <u>TSGNTIYNPSLKS</u> VTMSVDTSKNQFSLRLTSVTAADTAVYYCARG <u>N</u> <u>PLATYFGY</u> WGQGT ₁ LVTVSS
43	HCDR1	GYYS
44	HCDR2	RIYTSNTIYNPSLKS
45	HCDR3	GNPLATYFGY
46	VL	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>KSSQSVLYSSN</u> <u>NKNYLA</u> WYQQKPGQPPLLIY <u>WASTRES</u> GVPD RFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QQYYS</u> <u>TMYT</u> FGQGT ₁ LEIK
47	LCDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA
48	LCDR2	WASTRES
49	LCDR3	QQYYSTMYT

Tabla 16. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CDH3 CDH3v5

SEQ ID NO	Descripción	CDH3v5
90	Secuencia de la cadena pesada	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS<u>SSYYW</u> <u>SWFRQ</u>PAGKGLEWIG<u>RIYSSGSTNYNPSLKS</u>RVT MSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARG<u>GMGVT</u> <u>GLFDY</u>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
91	Secuencia de la cadena liviana	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNN KNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTMYT FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

52	VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <u>SYYW</u> <u>SWFRQPAGKGLEWIGRIYSSGSTNYNPSLKS</u> RVT MSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARG <u>GMGVT</u> <u>GLFDY</u> WGQGTTLVTVSS
53	HCDR1	SYYWS
54	HCDR2	RIYSSGSTNYNPSLKS
55	HCDR3	GMGVTGLFDY
56	VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>KSSQSVLYSSNN</u> <u>KNYLA</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QQYYSTMY</u> <u>TFGQGTKLEIK</u>
57	LCDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA
58	LCDR2	WASTRES
59	LCDR3	QQYYSTMYT

Tabla 17. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CDH3 CDH3v6

SEQ ID NO	Descripción	CDH3v6
92	Secuencia de la cadena pesada	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIN<u>NIYYW</u> <u>TI</u>WIRQPAGKGLEWIG<u>RIYSSGSTNYTPSLKSRVT</u> MSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCAR<u>EGYND</u> <u>GYGYFDH</u>WGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLT V L HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKS LSLSPG
93	Secuencia de la cadena liviana	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN<u>CSSQSVLYSSKN</u> <u>KNYLA</u>WYQQKPGQPPKLLIY<u>WASTRES</u>GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC<u>QQYYSTFRT</u> FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

62	VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIN <u>NYYW</u> <u>TWIRQPAGKGLEWIGRIYSSGSTNYTPSLKS</u> SRVT MSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCAR <u>EGYND</u> <u>GYGYFDHWGQGT</u> LVTVSS
63	HCDR1	NYYWT
64	HCDR2	RIYSSGSTNYTPSLKS
65	HCDR3	EGYNDGYGYFDH
66	VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>KSSQSVLYSSKN</u> <u>KNYLA</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QQYYSTFRT</u> FGQGTKVEIK
67	LCDR1	KSSQSVLYSSKNKNYLA
68	LCDR2	WASTRES
69	LCDR3	QQYYSTFRT

2.5: Determinación basada en SPR de las afinidades de unión de las moléculas biespecíficas a la CDH3 recombinante

La afinidad de unión de las construcciones anti-CDH3/TRAILR2 purificadas para la CDH3 de humano recombinante (EC1-EC2 o EC2-EC3 de longitud completa) se determinó mediante Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR), usando un instrumento ProteOn XPR36 (Bio-Rad). La solución amortiguadora de corrida y todas las diluciones (excepto en donde se indica) se realizaron en PBS-TEDTA. El chip sensor GLM (Bio-Rad) se normalizó y se preacondicionó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El chip sensor se activó con una mezcla igual de EDC/s-NHS en la

dirección horizontal durante 300 segundos a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ y se inmovilizó con proteína A/G (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en acetato 10 mM a pH 4,5) en la dirección horizontal durante 300 segundos a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ resultando en 5000 RU de proteína A/G en la superficie. El chip sensor se desactivó con etanolamina HCl 1 M en la dirección horizontal durante 300 segundos a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. El chip sensor se estabilizó con 18 segundos de ácido fosfórico 0,85% a una velocidad de flujo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 3 veces de manera horizontal y 3 veces de manera vertical.

Para la determinación de la cinética de unión a CDH3, las moléculas biespecíficas se capturaron individualmente en la superficie de la proteína A/G de manera vertical durante 150 segundos a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. La línea de base se estabilizó mediante la inyección de PBS-T-EDTA durante 60 segundos a una velocidad de flujo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ de manera horizontal. El analito (CDH3 humana de longitud completa, CDH3 [EC1-EC2] o CDH3 [EC2-EC3]) se inyectó de manera horizontal sobre el anticuerpo capturado durante 300 segundos a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ y una disociación durante 1200 segundos. La concentración de los analitos inyectada fue de 200 nM para la CDH3 de longitud completa y 500 nM para EC1-EC2 y EC2-EC3. La superficie se regeneró mediante la inyección de solución de ácido fosfórico 0,85% durante 18 segundos a una velocidad de flujo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ una vez de manera horizontal y una vez de manera vertical. Los datos se procesaron mediante la sustracción de la señal de fondo (interacciones con la superficie del sensor) y luego se ajustaron a un modelo cinético de Langmuir 1:1 para obtener las constantes de velocidad y las afinidades.

Las afinidades a CDH3 (de longitud completa o EC1-EC2) se encontraron en el rango de nM bajo. Las afinidades de unión al péptido EC2-EC3 se encontraron en el rango de nM bajo (mapeando el epítopo a EC2) o por debajo del nivel de detección (mapeando el epítopo a EC1).

Los resultados se muestran en la Tabla 18 a continuación, en donde se clasifican las moléculas de unión producidas que comprenden CDH3v1, CDH3v2, CDH3v3 o CDH3v7 como unidores a EC1 y aquellas que comprenden CDH3v4, CDHv5 o CDHv6 como unidores a EC2.

Tabla 18: afinidades (KD) de proteínas de unión anti-CDH3/TRAILR2 a CDH3 humano determinadas por análisis de SPR

Biespecífica molécula anti- CDH3/TRAILR2	Mapeo de epitopes (unidor EC1 o EC2)	kD de HuCDH3 de longitud completa (nM)	kD de HuCDH3 EC1-EC2 (nM)	kD de HuCDH3_EC2- EC3 (nM)
CDH3/TR2v1	EC1	8,52	6,7	BDL
CDH3/TR2v2	EC1	9,93	11,40	BDL
CDH3/TR2v3	EC1	1,08	0,85	BDL
CDH3/TR2v4	EC2	5,36	1,62	1,06
CDH3/TR2v5	EC2	2,43	2,76	29,80
CDH3/TR2v6	EC2	3,19	2,79	35,10
CDH3/TR2v7	EC1	3,29	4,00	BDL

BDL: por debajo del límite de detección

Ejemplo 3: Ensayo de muerte celular *in vitro*

Los Ejemplos descritos precedentemente muestran la preparación de moléculas biespecíficas que reconocen a TRAILR2 y CDH3 de humano. Se prepararon diferentes moléculas biespecíficas en base al formato descrito en la **Figura 3** con el objetivo de examinar si estas moléculas podían provocar una reducción en la viabilidad celular y si cualquier reducción fue provocada por apoptosis.

3.1 Caracterización de la expresión de la diana en el modelo de la línea celular GP2d.

La línea celular GP2d, que deriva de un adenocarcinoma de colon de humano, se seleccionó para realizar los ensayos de muerte celular. Se confirmó la expresión proteica de TRAILR2 y de CDH3 en la superficie de las células GP2d mediante citometría de flujo de la siguiente manera. Las células se despegaron usando solución Versene (Gibco 15040066) y se lavaron dos veces con solución amortiguadora para FACS (PBS, Gibco 14190; FCS 3%, Gibco 26140; y NaN_3 0,09%, Sigma Aldrich S2002). Se contaron las células usando el ViCell (Beckman Coulter Life Sciences) y el número de células se ajustó a 2×10^6 células/ml. Después de sembrar la suspensión de células a 100 μl /pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se centrifugó la placa a 1200 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se resuspendieron las células en la dilución del anticuerpo primario (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron durante 60 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora para FACS y se agregaron 100 μl /pocillo de la dilución apropiada de los anticuerpos secundarios/conjugados y se incubó durante 45 min a 4°C en la oscuridad.

Después de dos lavados con solución amortiguadora para FACS, se resuspendieron las células en 100 µl de solución amortiguadora para FACS por pocillo y se analizaron en un FACS Canto (BD Biosciences). Para la detección de TRAILR2, se usó un anticuerpo anti-CD262 de humano conjugado (DR5) con PE (eBioscience, 12-9908-42). Para la detección de CDH3, se usó el anticuerpo anti-P-cadherina (GeneTex GTX52961) seguido por un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón con FITC. Como control, se usó un control de isotipo IgG de ratón. En la **Figura 4** se muestra la expresión proteica en superficie de TRAILR2 y CDH3 en células GP2d células, con ambas proteínas proveyendo una expresión significativa.

3.2 Efecto de las moléculas biespecíficas anti-CDH3/TRAILR2 sobre las células GP2d (in vitro 2D)

Habiendo identificado a las células GP2d como una línea de células cancerosas adecuadas para evaluar la función de las moléculas de unión biespecíficas anti-CDH3/TRAILR2, se ideó el siguiente ensayo. Las células GP2d se plaquearon en medio de cultivo (RPMI1640/Glutamax, Gibco 61870-010; más FCS 10%, Gibco 26140). Después de reposar durante la noche a 37°C y CO₂ al 5%, se incubaron las células durante 24 horas con 50 µl de diferentes diluciones de anticuerpo o molécula de unión a las concentraciones deseadas. Luego se evaluó la viabilidad celular mediante el uso del ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega G7571) de acuerdo con las instrucciones provistas por el fabricante. Finalmente, se registró la luminiscencia usando el lector de placas VICTOR X4 2030 Multilabel de Perkin Elmer. Como control, se usaron unidores de TRAILR2, una IgG anti-TRAILR2, típicamente llamada Lexatumumab (HGS-ETR2, WO2003054216A3), y un nanobody anti-

TRAILR2 (WO2011098520A1) (ambos sintetizados internamente). La fuente de la secuencia para Lexatumumab se obtuvo de la Organización Mundial de la Salud, tal como está descrita en los nombres comunes internacionales recomendados (World Health Organization. Recommended international nonproprietary names, list 57. *WHO Drug Information* 2007;21:53–83.). El vector de expresión del nanobody anti-TRAILR2 fue elaborado como se describe en WO 2011/098520, SEQ ID No: 032.

Las células GP2d se incubaron durante 24 horas con (i) la molécula biespecífica (CDH3/TR2v1), (ii) anticuerpo anti-TRAILR2 solo (Lexatumumab), (iii) anticuerpo anti-CDH3 solo (anti-CDH3v1 o anti-CDH3v2), o (iv) la combinación equivalente de anticuerpos anti-TRAILR2 y anti-CDH3 (CDH3v1 o CDH3v2).

En la Figura 5 se muestra el efecto de estas moléculas sobre la viabilidad celular. Las dos moléculas contra CDH3 (anti-CDH3v1 o anti-CDH3v2) solas no tuvieron efecto sobre la viabilidad celular. El anticuerpo anti-TRAILR2 (Lexatumumab) solo, fue capaz de disminuir significativamente la viabilidad celular (EC50: 5,802 nM), y el agregado de anti-CDH3 en combinación libre (anti-CDH3v1 o anti-CDH3v2) no cambió el efecto observado con el anticuerpo anti-TRAILR2 solo. La molécula de unión biespecífica anti-CDH3/TRAILR2 CDH3/TRAILR2v1 descrita precedentemente lleva a una muerte potente de las células GP2d (EC50: 0,337 nM) con una potencia aumentada en 17 veces en comparación con el anticuerpo anti-TRAILR2 solo (Lexatumumab) o el anticuerpo anti-TRAILR2 en combinación con el anticuerpo anti-CDH3 (anti-CDH3v1 o anti-CDH3v2).

Se compararon diferentes moléculas biespecíficas con el nanobody tetravalente anti-TRAILR2 en el mismo ensayo usando células GP2d.

En la Figura 6 se muestran las potencias de 4 moléculas biespecíficas uniéndose a TRAILR2 y al dominio EC1 de CDH3 (CDH3/TRAILR2v1, CDH3/TRAILR2v2, CDH3/TRAILR2v3, CDH3/TRAILR2v7), que fueron de aproximadamente 55 veces, 11 veces, o 7 veces menos potente que el nanobody anti-TRAILR2.

En la Figura 7 se muestran las potencias de 3 moléculas biespecíficas que se unen a TRAILR2 y al dominio EC2 de CDH3 (CDH3/TRAILR2v4, CDH3/TRAILR2v5, CDH3/TRAILR2v6), que fueron de aproximadamente 15 veces, 327 veces, u 8 veces menos potente que el nanobody anti-TRAILR2.

3.3 Efecto de las moléculas biespecíficas anti-CDH3/TRAILR2 sobre las células GP2d que carecen de CDH3 (in vitro 2D)

Luego se confirmó que el aumento en la apoptosis modulado por las moléculas de unión biespecíficas anti-CDH3/TRAILR2 de la invención está mediado de manera específica por la CDH3 presente en la superficie de las células GP2d. Para demostrar esto, se generaron células GP2d que carecen de CDH3 en la superficie celular (células con noqueo de CDH3) mediante edición génica usando el sistema CRISPR/Cas9. Tal como se muestra en la Figura 8, la citometría de flujo confirmó la ausencia de la proteína CDH3 sobre las células con noqueo de GP2d-CDH3 (CDH3-KO), que retuvieron la proteína TRAILR2 en la superficie similar a las células GP2d isogénicas (CDH3 de tipo salvaje). Las mismas moléculas biespecíficas ensayadas previamente en las células GP2d se ensayaron sobre células GP2d CDH3 KO.

En la Figura 9 se muestra que el anticuerpo anti-TRAILR2 (Lexatumumab) solo disminuye significativamente la viabilidad celular (EC50: 7,192 nM) de células GP2d con noqueo de CDH3, similar al efecto observado sobre las células GP2d de tipo salvaje (EC50: 5,802 nM; Figura 5), y el agregado de anti-CDH3 en combinación libre (anti-CDH3v1 o anti-CDH3v2) no cambió el efecto observado con el anticuerpo anti-TRAILR2 solo. Por el contrario, la molécula de unión biespecífica anti-CDH3/TRAILR2 CDH3/TRAILR2v1 tuvo solo un impacto pequeño sobre la viabilidad celular de células GP2d con noqueo de CDH3 y no alcanzó el 50% de muerte celular a la mayor concentración ensayada (200 nM).

En la Figura 10 se muestra la potencia del nanobody anti-TRAILR2 sobre las células GP2d CDH3 KO, que fue similar a la detectada previamente en células GP2d WT. Por el contrario, las 4 moléculas biespecíficas de unión a TRAILR2 y al dominio EC1 de CDH3 (CDH3/TRAILR2v1, CDH3/TRAILR2v2, CDH3/TRAILR2v3, CDH3/TRAILR2v7) mostraron una carencia significativa de potencia y fueron aproximadamente 41666 veces, 12602 veces, o 21504 veces menos potente que el nanobody anti-TRAILR2.

En la Figura 11 se muestra la potencia de 3 moléculas biespecíficas que se unen a TRAILR2 y al dominio EC2 de CDH3 (CDH3/TRAILR2v4, CDH3/TRAILR2v5, CDH3/TRAILR2v6), que fueron todas más de 30000 veces menos potentes que el nanobody anti-TRAILR2.

Esto confirma que las moléculas biespecíficas generadas en el presente estudio solo inducen la apoptosis en presencia de CDH3, mientras que los anticuerpos anti-TRAILR2, Lexatumumab y el nanobody anti-TRAILR2, inducen la apoptosis sin importar si CDH3 está presente o no.

Ejemplo 4: Efecto de las moléculas biespecíficas anti-CDH3/TRAILR2 sobre las células NCI-H358 (*in vitro* 3D)

Con el objetivo de extender el análisis *in vitro*, las moléculas biespecíficas anti-CDH3/TRAILR2 fueron ensayadas en una línea celular cultivada como esferoides (modelo de cultivo en 3D) con el objetivo de mimetizar las condiciones de cultivo de un tumor *in vivo*. Las células NCI-H358, que derivan de un adenocarcinoma de pulmón, se plaquearon en 2% Cultrex 3D RGF BME (R+D Systems 3445-005-01) en placas para microtitulación de 96 pocillos de unión ultrabaja de fondo redondo transparente (Corning, 7007) a 2.000 células por pocillo. Las células se trataron durante 48h con diluciones seriales de las mismas moléculas que se ensayaron en el ejemplo 3 en células GP2d. Las células NCI-H358 se incubaron con (i) la molécula biespecífica (CDH3/TRAILR2v1), (ii) anticuerpo anti-TRAILR2 solo (Lexatumumab o el nanobody anti-TRAILR2), (iii) anticuerpo anti-CDH3 solo (anti-CDH3v1 o anti-CDH3v2), o (iv) una combinación de los anticuerpos anti-TRAILR2 (Lexatumumab) y anti-CDH3 (CDH3v1 o CDH3v2).

En la Figura 12 se muestra el efecto de estas moléculas sobre la viabilidad celular en el modelo 3D NCI-H358. No se detectó efecto sobre la viabilidad celular con las moléculas anti-CDH3 solas (anti-CDH3v1 o anti-CDH3v2), Lexatumumab solo, o la combinación de anti-CDH3 con Lexatumumab. Solo se detectó una eficacia similar con CDH3/TRAILR2v1 y el nanobody anti-TRAILR2. En la Figura 13 se muestra el ensayo de unión a EC1 de las moléculas anti-CDH3/TRAILR2 (CDH3/TRAILR2v1, CDH3/TRAILR2v2, CDH3/TRAILR2v3 y CDH3/TRAILR2v7) que mostraron todas una eficacia similar a TAS266. Por el contrario, las moléculas anti-CDH3/TRAILR2 de unión a EC2

(CDH3/TRAILR2v4, CDH3/TRAILR2v5, CDH3/TRAILR2v6) mostraron una eficacia reducida en comparación con los unidores de EC1 y TAS266 (Figura 14).

Esto muestra que, sorprendentemente, solo las moléculas biespecíficas de unión a EC1 pueden inducir apoptosis con una eficacia similar al nanobody anti-TRAILR2, aunque con una precisión significativamente aumentada ya que solo están dirigidas a las células que expresan CDH3. Por el contrario, las moléculas biespecíficas de unión a EC2 CDH3/TRAILR2v4, CDH3/TRAILR2v5 y CDH3/TRAILR2v6 no alcanzaron el nivel de eficacia del nanobody anti-TRAILR2.

Ejemplo 5: Las moléculas anti-CDH3/TRAILR2 inducen la activación de caspasa-8 en células GP2d

Luego se investigó si la reducción en la viabilidad celular fue causada por la inducción de la apoptosis inducida por TRAIL, que está mediada por el reclutamiento y activación de caspasa-8. Para determinar si los anticuerpos y moléculas de unión elaborados en la presente tienen la capacidad de activar de manera específica la vía apoptótica, los inventores midieron la actividad de la caspasa-8 en la línea celular GP2d. Para preparar el experimento, las células GP2d se dejaron reposar durante la noche a 37°C y CO₂ 5% y se incubaron al día siguiente con diferentes diluciones de anticuerpo o de molécula de unión variando en un rango entre 0,001 y 10 nM. La actividad de la Caspasa-8 se midió 7h después del tratamiento en extractos de células recolectadas usando el ensayo Promega Caspase-Glo 8 (Cat. #G8201) respectivamente. Luego se midió la luminiscencia de cada muestra usando el Lector de placas VICTOR X4 2030 Multilabel de Perkin Elmer.

En la Figura 15 se muestra la actividad de la caspasa 7h después del tratamiento con una molécula de unión biespecífica anti-CDH3/TRAILR2 de la invención, el nanobody anti-TRAILR2 o Lexatumumab en relación a los controles sin tratar. El Lexatumumab aumentó la caspasa 8 activa solo aproximadamente 2 veces a la mayor concentración (10 nM). Por el contrario, se detectaron aumentos de la Caspasa 8 activada con concentraciones de 0,1 nM (o mayores) de CDH3/TRAILR2v1 y del nanobody anti-TRAILR2. Los niveles de la Caspasa 8 activada aumentaron de manera similar con concentraciones mayores de la molécula de unión biespecífica anti-CDH3/TRAILR2 y el nanobody anti-TRAILR2 y fueron de aproximadamente 15 veces superiores al basal para un tratamiento con 10 nM. Estos datos demuestran que la disminución en la viabilidad celular observada en los ensayos de muerte celular no es debido a mecanismos inespecíficos, y que la molécula biespecífica para CDH3/TRAILR2 tiene la capacidad de inducir de manera eficaz y específica la apoptosis en las células diana. De acuerdo con los datos de viabilidad celular, se observó que la inducción de las células GP2d con la molécula de unión biespecífica anti-CDH3/TRAILR2 resultó en una mayor activación de la caspasa-8 en comparación con el anticuerpo anti-TRAILR2 Lexatumumab.

Ejemplo 6: Actividad antitumoral *in vivo* de las moléculas CDH3/TRAILR2 en el modelo de xenoinjerto de GP2d

Se investigó la eficacia *in vivo* de tres moléculas anti-CDH3/TRAILR2 de unión al dominio EC1 y tres de unión al dominio EC2. Para este propósito, se injertaron células cancerosas GP2d en ratones inmunodeficientes y se midió el efecto de la administración de una molécula de la invención sobre el volumen del tumor. Se injertaron ratones BomTac:NMRI-Foxn1nu hembra por vía subcutánea

con $5,0 \times 10^6$ células Gp2d (en 0,1 mL de FBS 5% con una proporción de PBS:Matrigel de 1:1 (v/v)) y se monitoreó el crecimiento del tumor hasta que alcanzó aproximadamente 200 mm³. Los ratones se aleatorizaron en siete grupos y se administró una inyección única de control con vehículo, unido a EC1 (CDH3/TRAILR2v1, CDH3/TRAILR2v2, o CDH3/TRAILR2v3), o unido a EC2 (CDH3/TRAILR2v4, CDH3/TRAILR2v5, o CDH3/TRAILR2v6) a 1 mg/kg por vía intravenosa (i.v.). Posteriormente se monitoreó el crecimiento del tumor durante 34 días, excepto para la cohorte tratada con vehículo que se le practicó eutanasia después de 24 días cuando se alcanzó el límite superior del tumor de 1000 mm³.

Los datos que se presentan en la Figura 16 demuestran que las moléculas de unión de la invención tienen la capacidad de inducir reducciones significativas y prolongadas del volumen del tumor en comparación con el grupo control. Inesperadamente, las moléculas de unión a EC1 mostraron una eficacia superior en comparación con las moléculas de unión a EC2. Los unidores a EC1 llevaron a regresiones a largo plazo con 132 %, 125 % y 125% de inhibición del crecimiento del tumor, respectivamente. Por el contrario, si bien el tratamiento único con las moléculas de unión a EC2 llevó a regresiones iniciales, se observó un rebrote del tumor a partir del día 10 llevando solo a 70 %, 61 % y 102 % de inhibición del crecimiento del tumor, respectivamente.

Ejemplo 7: Capacidad de internalización de moléculas biespecíficas de CDH3/TRAILR2 de unión a EC1

La velocidad de internalización mediada por endocitosis y la degradación lisosomal de fármacos biológicos de unión a receptores de superficie afecta su estabilidad y por lo tanto su vida media en plasma y la duración de la respuesta. Los compuestos de unión a EC1 de CDH3 desarrollados previamente por otros

mostraron una alta capacidad de internalización (WO12057328A1) y por lo tanto podrían tener menos capacidad de sostener una activación duradera y eficaz de TRAILR2 en la superficie de la célula si se usan en una configuración de compuesto biespecífico.

Se analizó la capacidad de un compuesto biespecífico de CDH3/TRAILR2 de unión a EC1 ejemplificativo, el anticuerpo de unión a TRAILR2 Lexatumumab, o un anticuerpo específico anti-EC1 de CDH3 para internalizar en comparación con un anticuerpo anti-CDH3 competente para la internalización, disponible comercialmente (#MAB861, bio-technne®, R&D systems). Para lograr esto, se sembraron células de cáncer colorrectal GP2d en placas de 96 pocillos (#3340, Corning, NY, EE.UU.) un día antes de la exposición al compuesto. Antes del agregado de los compuestos, los anticuerpos se sembraron con el reactivo de marcaje de anticuerpos Incucyte® Fabfluor-pH (#4722, Sartorius, Goettingen, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Luego se agregó el anticuerpo marcado con Fabfluor a las células a una concentración de 1 nM en un volumen total de 100 µl, y se analizaron las células para evaluar la señal roja de Fabfluor como un indicador de la internalización en el instrumento para análisis de células vivas Incucyte® S3 (Sartorius) con una magnificación de 10x, cuatro imágenes / pocillo cada 1h durante 24h.

Los datos que se presentan en la Figura 17 demuestran la falta de internalización medible (señal roja de Fabfluor no detectable) para un compuesto biespecífico de CDH3/TRAILR2, el anticuerpo anti-TRAILR2 Lexatumumab, y un compuesto anti-CDH3 de unión a EC1 a la concentración aplicada en comparación con el anticuerpo anti-CDH3 MAB861 de internalización moderada. La ausencia de internalización medible de un anticuerpo biespecífico de

CDH3/TRAILR2 de unión a EC1 ejemplificativo preparado en la presente es acorde con las regresiones del tumor a largo plazo observadas en el modelo de xenoinjerto de GP2d, como se demostró en la Figura 16.

Ejemplo 8: Estabilidad de las moléculas de unión biespecíficas anti-CDH3/TRAILR2 en condiciones de pH bajo

Se evaluó la estabilidad de las moléculas biespecíficas de CDH3/TRAILR2 en condiciones de pH bajo. Durante la elaboración, los productos biológicos se exponen a condiciones de pH bajo con el objetivo de lograr la elusión de la columna de afinidad (“paso de captura”). Las condiciones de pH bajo también se requieren para inactivar contaminantes potenciales tales como bacterias, hongos y virus. La depuración eficaz de los potenciales contaminantes es un paso importante durante la elaboración de los productos biológicos usando líneas celulares de mamífero para asegurar la seguridad del fármaco. Para muchas proteínas recombinantes, sin embargo, la incubación con pH bajos provoca la agregación y reduce el rendimiento de proteína recuperada. Por lo tanto, la estabilidad de la proteína a pH bajo es un factor importante de la elaboración exitosa y eficaz de proteínas terapéuticas.

Para ensayar la estabilidad de las moléculas de unión biespecíficas anti-CDH3/TRAILR2 a pH bajo, se ajustó el pH a pH 3,5 con ácido acético 1 M, seguido por incubación durante 90 minutos a temperatura ambiente, seguido por neutralización a pH 5,0 con solución amortiguadora Tris 1 M (pH 9,0). La concentración de la muestra se midió y se determinó la formación potencial de agregados (especies de alto peso molecular, HMWS) o fragmentos (especies de bajo peso molecular, LMWS) mediante cromatografía de exclusión molecular analítica (aSEC).

Los resultados se resumen en la Tabla 19 a continuación, demostrando que ninguna de las moléculas de unión a CDH3/TRAILR2v1, CDH3/TRAILR2v2, CDH3/TRAILR2v3, CDH3/TRAILR2v4, CDH3/TRAILR2v5, CDH3/TRAILR2v6 o CDH3/TRAILR2v7 mostró ningún aumento significativo de HMWS (<1,06 %) o LMWS (0%), o ninguna disminución significativa del pico principal (< 1,06 %) en comparación con el material de partida, lo que demuestra una buena estabilidad después de la incubación durante 90 minutos a pH 3,5.

Tabla 19: afinidades (KD) de proteínas de unión anti-CDH3/TRAILR2 a CDH3 humano determinadas por análisis de SPR

Biespecífica molécula anti-CDH3/TRAILR2	Estabilidad de aSEC – 90 min, RT		
	$\Delta\%$ de HMWS	$\Delta\%$ principal	$\Delta\%$ de LMWS
CDH3/TRAILR2v1	-0,68	-0,70	0,00
CDH3/TRAILR2v2	-0,17	0,17	0,00
CDH3/TRAILR2v3	-0,04	0,04	0,00
CDH3/TRAILR2v4	0,54	-0,54	0,00
CDH3/TRAILR2v5	-0,29	0,37	-0,08
CDH3/TRAILR2v6	1,06	-1,06	0,00
CDH3/TRAILR2v7	0,02	-0,02	0,00