

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 912 932**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2014** **E 18163581 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2022** **EP 3406633**

54 Título: **Anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

25.07.2013 US 201361858402 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2022

73 Titular/es:

**CYTOMX THERAPEUTICS INC. (100.0%)
151 Oyster Point Blvd, Suite 400
South San Francisco CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**IRVING, BRYAN ALLEN;
HOSTETTER, DANIEL ROBERT;
WONG, CHIHUNT;
LOWMAN, HENRY BERNARD;
WEST, JAMES WILLIAM y
LA PORTE, SHERRY LYNN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 912 932 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos y procedimientos de uso de los mismos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere generalmente a anticuerpos activables biespecíficos que se unen específicamente a dos dianas o epítopos diferentes, así como a procedimientos de fabricación y uso de estos anticuerpos activables biespecíficos en una variedad de indicaciones terapéuticas, diagnósticas y profilácticas.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los anticuerpos monoclonales han surgido como moléculas para intervención terapéutica en una variedad de trastornos. Sin embargo, dirigirse a o neutralizar una sola proteína no siempre es suficiente para el tratamiento efectivo de ciertos trastornos, lo que limita el uso terapéutico de anticuerpos monoclonales monoespecíficos. Por otra parte, las terapias basadas en anticuerpos han demostrado ser tratamientos efectivos para varias enfermedades, pero en algunos casos, las toxicidades debidas a una expresión diana amplia han limitado su eficacia terapéutica. Además, terapias basadas en anticuerpos han mostrado otras limitaciones, tal como la depuración rápida de la circulación después de la administración. El documento WO2010/081173 describe anticuerpos modificados que contienen un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB) modificado con un resto de enmascaramiento (MM). Dichos anticuerpos modificados pueden acoplarse además a un resto escindible (CM), lo que resulta en anticuerpos activables (AA), donde el CM es capaz de escindir, reducirse, fotolizarse o modificarse de otro modo. El documento US2013/150558 describe anticuerpos anti-EGFR enmascarados y establece que dos mAb pueden formar un heterodímero para producir un complejo de mAb enmascarado cruzado. Donaldson y col. (2009) Cancer Biology & Therapy, 8:22, pp. 2147-152, investigó fragmentos de anticuerpos anti-EGFR enmascarados. Reusch y otros. (2006) Clinical Cancer Research, 12:1, pp. 183-190, investigó la selección de anticuerpos EGFR combinados con citotoxicidad mediada por células T.

Por consiguiente, existe una necesidad de anticuerpos y agentes terapéuticos que permitan direccionamiento de múltiples dianas y/o múltiples epítopos con una sola molécula y también proporcionan una mayor selectividad para las dianas deseadas y una reducción de los efectos adversos tras la administración.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un anticuerpo activable biespecífico, tal como se define por el conjunto de reivindicaciones adjunto.

Un aspecto de la presente descripción proporciona anticuerpos multiespecíficos y anticuerpos activables multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos proporcionados en esta invención son anticuerpos que reconocen dos o más antígenos o epítopos diferentes. Los anticuerpos activables multiespecíficos proporcionados en esta invención son anticuerpos multiespecíficos que incluyen al menos un resto de enmascaramiento (MM) unido al menos a un dominio de unión a antígeno o epítipo del anticuerpo multiespecífico de tal forma que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del dominio de unión a antígeno o epítipo para unirse a su diana. En algunas realizaciones, el MM está acoplado al dominio de unión a antígeno o epítipo del anticuerpo multiespecífico a través de un resto escindible (CM) que funciona como un sustrato para una proteasa. Los anticuerpos multiespecíficos activables proporcionados en esta invención son estables en circulación, se activan en los sitios previstos de terapia y/o diagnóstico, pero no en tejido normal, es decir, tejido sano, y, cuando se activan, exhiben unión a una diana que es al menos comparable al anticuerpo correspondiente multiespecífico no modificado.

En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos se diseñan para acoplarse a células efectoras inmunitarias, también denominadas en esta invención como anticuerpos multiespecíficos de acoplamiento inmunitario-efector y/o anticuerpos activables multiespecíficos de acoplamiento inmunitario-efector. En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos están diseñados para acoplarse a leucocitos, también denominados en esta invención como anticuerpos activables multiespecíficos de acoplamiento a leucocitos y/o anticuerpos activables multiespecíficos de acoplamiento a leucocitos. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos están diseñados para acoplarse a células T, también denominados en esta invención anticuerpos multiespecíficos de acoplamiento a células T y/o anticuerpos activables multiespecíficos de acoplamiento a células. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos se acoplan a un antígeno de superficie en un leucocito, tal como en un célula T, en una célula citolítica natural (NK), en una célula mononuclear mieloide, en un macrófago, y/o en otra célula efectora inmune. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es un leucocito. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es una célula T. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es una célula NK. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es una célula mononuclear, tal como una célula mononuclear mieloide. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos están diseñados para unirse o interactuar de otro modo con más de una diana y/o más de un epítipo, también denominados en esta invención como anticuerpos dirigidos a múltiples antígenos y/o anticuerpos activables dirigidos a múltiples antígenos. Como se

usa en esta invención, los términos "diana" y "antígeno" se usan indistintamente.

En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos que se acoplan a células efectoras inmunitarias incluyen un anticuerpo dirigido o fragmento de unión al antígeno del mismo y un anticuerpo de acoplamiento de células efectoras o porción de unión al antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células efectoras inmunitarias multiespecíficas incluye un anticuerpo dirigido al cáncer o fragmento de unión al antígeno del mismo y un anticuerpo de acoplamiento de célula efectora inmunitaria o porción de unión al antígeno del mismo. En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria que se acopla a anticuerpos multiespecíficos incluye un anticuerpo IgG dirigido contra cáncer o fragmento de unión al antígeno del mismo y una célula efectora inmunitaria que se acopla a scFv. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es un leucocito. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es una célula T. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es una célula NK. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es una célula mononuclear mieloide.

En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos de acoplamiento de células T incluyen un anticuerpo dirigido o fragmento de unión al antígeno del mismo y un anticuerpo de acoplamiento al célula T o porción de unión al antígeno del mismo. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos de acoplamiento de células T incluyen un anticuerpo dirigido al cáncer o fragmento de unión al antígeno del mismo y un anticuerpo de acoplamiento de células T o porción de unión al antígeno del mismo. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos de acoplamiento de células T incluyen un anticuerpo IgG dirigido contra cáncer o fragmento de unión al antígeno del mismo y un scFv que se acopla a células T. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico de acoplamiento a célula T incluye un scFv épsilon anti-CD3 (CD3 ϵ , también denominado en esta invención como CD3c y CD3) y un anticuerpo dirigido o fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico que se acopla a células T incluye un anti-CD3 ϵ scFv y un anticuerpo dirigido al cáncer o fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico de acoplamiento de células T incluye un anti-CD3 ϵ scFv y un anticuerpo de IgG dirigido contra cáncer o fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico de acoplamiento de células T incluye un seFv anti-CD3 épsilon (CD3 ϵ) que se deriva de OKT3. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico de acoplamiento de células T incluye un scFv anti-CTLA-4.

En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos que se acoplan a células efectoras inmunitarias de la descripción incluyen un anticuerpo dirigido o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo que se une a células efectoras inmunitarias o una parte de unión a antígeno del mismo, donde al menos uno de los anticuerpos dirigidos o fragmento de unión a antígeno del mismo y/o el anticuerpo que se acopla a la célula efectora inmunitaria o la porción que se une al antígeno del mismo está enmascarada. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células efectoras inmunes o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento a células efectoras inmunes, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a la primera diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2), de modo que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células efectoras inmunes o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento a células efectoras inmunes, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a la primera diana, y el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células efectoras no inmunes es un anticuerpo dirigido a un cáncer. En algunas realizaciones, el anticuerpo efector de células no inmunes es una IgG. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células efectoras inmunes es un scFv. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido (por ejemplo, el anticuerpo efector de células no inmunes) es una IgG, y el anticuerpo de acoplamiento a células efectoras inmunes es un scFv. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es un leucocito. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es una célula T. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es una célula NK. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es una célula mononuclear mieloide.

En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos de acoplamiento a células T de la descripción incluyen un anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo de acoplamiento de células T o porción de unión a antígeno del mismo, donde al menos uno del anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo y/o el anticuerpo de acoplamiento a células T o porción de unión a antígeno del mismo está enmascarado. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento de unión al antígeno del mismo incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera Diana de acoplamiento de células T, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de modo que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 de unirse a la primera diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo

que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células T o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento a células T, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a la primera diana, y el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana.

En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos de acoplamiento a células T incluyen un anticuerpo dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo de acoplamiento de células T o porción de unión a antígeno del mismo, donde al menos uno del anticuerpo dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo y/o el anticuerpo de acoplamiento a células T o porción de unión a antígeno del mismo está enmascarado. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células T o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento a células T, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a la primera diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana relacionada con cáncer, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana relacionada con cáncer. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células T o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento a células T, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a la primera diana, y el anticuerpo dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana relacionada con cáncer, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana relacionada con cáncer.

En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos de acoplamiento de células T incluyen un anticuerpo de IgG dirigido a cáncer o fragmento de unión al antígeno del mismo y un scFv de acoplamiento a células T, donde al menos uno del anticuerpo de IgG dirigido a cáncer o fragmento de unión al antígeno del mismo y/o el anticuerpo de acoplamiento a células T o porción de unión al antígeno del mismo está enmascarado. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células T o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento a células T, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a la primera diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo IgG dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana relacionada con cáncer, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana relacionada con cáncer. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células T o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento a células T, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a la primera diana, y el anticuerpo de IgG dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana relacionada con cáncer, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana relacionada con cáncer.

En algunas realizaciones de un anticuerpo activable multiespecífico de acoplamiento de células efectoras inmunitarias, un antígeno es típicamente un antígeno presente en la superficie de una célula menor u otro tipo de célula asociado con la enfermedad, tal como, pero sin limitarse a, cualquier diana enumerada en la Tabla 1, tal como, pero sin limitarse a, EGFR, erBB2, EpCAM, Jagged, PD-L1, B7H3 o CD71 (receptor de transferrina) y otro antígeno es típicamente un receptor estimulante o inhibidor presente en la superficie de una célula T, célula citolítica natural (NK), célula mononuclear mieloide, macrófago y/u otra célula efectora inmunitaria, tal como, pero sin limitarse a, B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 o VISTA. En algunas realizaciones, el antígeno es un receptor estimulante presente en la superficie de una célula T o célula NK; ejemplos de dichos receptores estimulantes incluyen, pero sin limitarse a, CD3, CD27, CD28, CD137 (también denominado 4-1BB), GITR, HVEM, ICOS, NKG2D y OX40. En algunas realizaciones, el antígeno es un receptor inhibidor presente en la superficie de una célula T; ejemplos de dichos receptores inhibitorios incluyen, pero sin limitarse a, BTLA, CTLA-4, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3 y KIR expresadas en NK. El dominio del anticuerpo que confiere especificidad al antígeno de superficie de células T también puede estar sustituido por un ligando o dominio de ligando que se une a un receptor de células T, un receptor de células NK, un receptor de

macrófagos y/u otro receptor de células efectoras inmunes. B7-1, B7-2, B7H3, PD-L1, PD-L2 o TNFSF9.

Una realización de la descripción es un anticuerpo activable multiespecífico que es activable en un microambiente de cáncer y que incluye un anticuerpo, por ejemplo, una IgG o scFv, dirigido a una diana de tumor y un anticuerpo agonista, por ejemplo, una IgG o scFv dirigido a un receptor coestimulante expresado en la superficie de una célula T o célula NK activada, donde al menos uno del anticuerpo diana de cáncer y/o anticuerpo agonista está enmascarado. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a, CD27, CD137, GITR, HVEM, NKG2D y OX40. En esta realización, el anticuerpo activable multiespecífico, una vez activado por proteasas asociadas con tumores, reticularía y activaría efectivamente los receptores coestimuladores expresados por células T o células NK de una manera dependiente del tumor para mejorar la actividad de células T que responden a cualquier antígeno tumoral a través de su antígeno de células T endógeno o receptores activadores de NK. La naturaleza dependiente de la activación de estos receptores coestimuladores de células T o células NK centraría la actividad del anticuerpo activable multiespecífico activado a células T específicas del tumor, sin activar todas las células T independientemente de su especificidad de antígeno. En una realización, al menos el anticuerpo receptor coestimulador del anticuerpo activable multiespecífico se enmascara para impedir la activación de células T autorreactivas que pueden estar presentes en tejidos que también expresan el antígeno reconocido por el anticuerpo dirigido a la diana tumoral en el anticuerpo activable multiespecífico, pero cuya actividad está restringida por la falta de acoplamiento del co-receptor.

Una realización de la descripción es un anticuerpo activable multiespecífico que se puede activar en una enfermedad caracterizada por sobreestimulación de células T, tal como, pero sin limitarse a, una enfermedad autoinmunitaria o microambiente de enfermedad inflamatoria. Dicho anticuerpo activable multiespecífico incluye un anticuerpo, por ejemplo una IgG o scFv, dirigida a una diana que comprende un antígeno de superficie expresado en un tejido dirigido por una célula T en enfermedad autoinmune o inflamatoria y un anticuerpo, por ejemplo una IgG o acFv, dirigida a un receptor inhibitor expresado en la superficie de una célula T o célula NK, donde al menos uno del anticuerpo diana de tejido de enfermedad y/o anticuerpo receptor inhibitor de células T está enmascarado. Ejemplos de receptores inhibidores incluyen, pero sin limitarse a, BTLA, CTLA-4, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3, y KIR expresadas en NK. Ejemplos de un antígeno tisular dirigido por células T en enfermedad autoinmunitaria incluyen, pero sin limitarse a, un antígeno de superficie expresado en mielina o células nerviosas en esclerosis múltiple o un antígeno de superficie expresado en células de islotes pancreáticos en diabetes tipo 1. En esta realización, el anticuerpo multiespecífico capaz de actuar cuando se localiza en el tejido bajo ataque autoinmunitario o inflamación se activa y se co-acopla al inhibidor/ receptor de células T o células NK para suprimir la actividad de células T autorreactivas que responden a cualquier antígeno dirigido al tejido de la enfermedad a través de su TCR endógeno o receptores de activación. En una realización, al menos uno o múltiples anticuerpos se enmascaran para impedir la supresión de las respuestas de células T deseadas en tejidos sin enfermedad donde también se puede expresar el antígeno diana.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico que se acopla a células T incluye un anti-CD3ε (CD3ε, también denominado en esta invención CD3ε y CD3) scFv y un anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde al menos uno del scFv anti-CD3ε y/o el anticuerpo dirigido o la porción de unión a antígeno del mismo está enmascarado. En algunas realizaciones, el CD3ε scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3ε, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CD3ε. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana. En algunas realizaciones, el CD3ε scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3ε, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CD3ε, y el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico de acoplamiento a células T incluye un anti-CD3ε scFv y un anticuerpo dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde al menos uno del anti-CD3ε scFv y/o el anticuerpo dirigido a cáncer o la porción de unión a antígeno del mismo está enmascarada. En algunas realizaciones, el CD3ε scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3ε, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CD3ε. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana relacionada con cáncer, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana relacionada con cáncer. En algunas realizaciones, el CD3ε scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3ε, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CD3ε, y el anticuerpo dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a

antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana relacionada con cáncer, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana relacionada con cáncer.

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico de acoplamiento a células T incluye un anti-CD3ε scFv y un anticuerpo de IgG dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde al menos uno de anti-CD3ε scFv y/o el anticuerpo de IgG dirigido a cáncer o porción de unión a antígeno del mismo está enmascarado. En algunas realizaciones, el CD3ε scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3ε, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento
- 10 del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CD3ε. En algunas realizaciones, el anticuerpo de IgG dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana relacionada con cáncer, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana relacionada con cáncer. En algunas realizaciones, el
- 15 CD3ε scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3ε, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CD3ε, y el anticuerpo de IgG dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana relacionada con cáncer, donde el AB2 está unido a un
- 20 resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana relacionada con cáncer.

- En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico de acoplamiento a células T incluye un anti-CD3 εpsilon (CD3ε) scFv que se deriva de OKT3, donde al menos uno del anticuerpo dirigido o fragmento de unión al antígeno del mismo y/o el scFv de OKT3 o scFv derivado de OKT3 está enmascarado. En algunas realizaciones, el
- 25 scFv de OKT3 o scFv derivado de OKT3 incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3ε, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CD3ε. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el
- 30 AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana. En algunas realizaciones, el scFv de OKT3 o scFv derivado de OKT3 incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3ε, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para
- 35 unirse a CD3ε, y el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana.

- 40 En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico que se acopla a células T incluye un scFv de OKT3 o scFv derivado de OKT3 y un anticuerpo dirigido al cáncer o fragmento de unión al antígeno del mismo, donde al menos uno del scFv de OKT3 o scFv derivado de OKT3 y/o el anticuerpo dirigido al cáncer o porción de unión al antígeno del mismo está enmascarado. En algunas realizaciones, el scFv de OKT3 o scFv derivado de OKT3 incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3ε, donde el AB1 está unido
- 45 a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CD3ε. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana relacionada con cáncer, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la
- 50 segunda diana relacionada con cáncer. En algunas realizaciones, el scFv de OKT3 o scFv derivado de OKT3 incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3ε, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CD3ε, y el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se
- 55 une a una segunda diana relacionada con cáncer, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana relacionada con cáncer.

- En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico de acoplamiento de células T incluye un scFv de OKT3 o scFv derivado de OKT3 y un anticuerpo de IgG dirigido a cáncer o fragmento de unión al antígeno del mismo, donde al menos uno del scFv de OKT3 o scFv derivado de OKT3 y/o el anticuerpo de IgG dirigido a cáncer o porción de unión al antígeno del mismo está enmascarado. En algunas realizaciones, el scFv de OKT3 o scFv derivado de
- 60 OKT3 incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3ε, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CD3ε. En algunas realizaciones, el anticuerpo de IgG dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o
- 65

fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana relacionada con cáncer, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana relacionada con cáncer. En algunas realizaciones, el scFv de OKT3 o scFv derivado de OKT3 incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3ε, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AS1 para unirse a CD3ε, y el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana relacionada con cáncer, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana relacionada con cáncer.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico que se acopla a células T incluye un anti-CTLA-4 scFv, donde al menos uno del anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo y/o el anti-CTLA-4 scFv está enmascarado. En algunas realizaciones, el CTLA-4 scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CTLA-4, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CTLA-4. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana. En algunas realizaciones, el anti-CTLA-4 scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CTLA-4, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CTLA-4, y el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico que se acopla a células T incluye un anti-CTLA-4 scFv y un anticuerpo de IgG dirigido o fragmento de unión al antígeno del mismo donde al menos uno de los anti-CTLA-4 scFv y/o el anticuerpo de IgG dirigido o porción de unión al antígeno del mismo está enmascarado. En algunas realizaciones, el CTLA-4 scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CTLA-4, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CTLA-4. En algunas realizaciones, el anticuerpo IgG dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana. En algunas realizaciones, el CTLA-4 scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CTLA-4, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a CTLA-4, y el anticuerpo de IgG dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana.

En algunas realizaciones, los anticuerpos dirigidos a múltiples antígenos y/o anticuerpos activables dirigidos a múltiples antígenos incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una primera diana y/o un primer epítipo y un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una segunda diana y/o un segundo epítipo. En algunas realizaciones, los anticuerpos dirigidos a múltiples antígenos y/o los anticuerpos activables dirigidos a múltiples antígenos se unen a dos o más dianas diferentes. En algunas realizaciones, los anticuerpos dirigidos a múltiples antígenos y/o los anticuerpos activables dirigidos a múltiples antígenos se unen a dos o más epítipos diferentes en la misma diana. En algunas realizaciones, los anticuerpos dirigidos a múltiples antígenos y/o anticuerpos activables dirigidos a múltiples antígenos se unen a una combinación de dos o más dianas diferentes y dos o más epítipos diferentes en la misma diana.

Varias realizaciones de anticuerpos activables multiespecíficos de la descripción se muestran en las Figuras 3 A y 5-9. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico que comprende una IgG tiene los dominios variables de IgG enmascarados. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico que comprende un scFv tiene los dominios de scFv enmascarados. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico tiene tanto dominios variables de IgG como dominios de scFv, donde al menos uno de los dominios variables de IgG está acoplado a un resto de enmascaramiento. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico tiene tanto dominios variables de IgG como dominios de scFv, donde al menos uno de los dominios de scFv está acoplado a un resto de enmascaramiento. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico tiene tanto dominios variables de IgG como dominios de scFv, donde al menos uno de los dominios variables de IgG está acoplado a un resto de enmascaramiento y al menos uno de los dominios de scFv está acoplado a un resto de enmascaramiento. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico tiene tanto dominios variables de IgG como dominios de scFv, donde cada uno de los dominios variables de IgG y los dominios de scFv está acoplado a su propio resto de

enmascaramiento. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo activable multiespecífico tiene especificidad por un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por un antígeno de superficie de células T. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo activable multiespecífico tiene especificidad para un antígeno diana y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad para otro antígeno diana. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo activable multiespecífico tiene especificidad para un epítipo de un antígeno diana y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad para otro epítipo del antígeno diana.

En un anticuerpo activable multispecifico, un scFv puede fusionarse al extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo activable de IgG, al extremo carboxilo de la cadena ligera de un anticuerpo activable de IgG, o al extremo carboxilo de tanto la cadena pesada como ligera de un anticuerpo activable de IgG. En un anticuerpo activable multispecifico, un scFv se puede fusionar al extremo amino de la cadena pesada de un anticuerpo activable de IgG, al extremo amino de la cadena ligera de un anticuerpo activable de IgG o a los extremos amino de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo activable de IgG. En un anticuerpo activable multispecifico, un scFv se puede fusionar a cualquier combinaci3n de uno o m3s extremos carboxilo y uno o m3s extremos amino de un anticuerpo activable de IgG. En algunas realizaciones, un resto de enmascaramiento (MM) unido a un resto escindible (CM) est3 unido y enmascara un dominio de uni3n a ant3geno de la IgG. En algunas realizaciones, un resto de enmascaramiento (MM) unido a un resto escindible (CM) est3 unido y enmascara un dominio de uni3n a ant3geno de al menos un scFv. En algunas realizaciones, un resto de enmascaramiento (MM) unido a un resto escindible (CM) est3 unido y enmascara un dominio de uni3n a ant3geno de una IgG, y un resto de enmascaramiento (MM) unido a un resto escindible (CM) est3 unido y enmascara un dominio de uni3n a ant3geno de al menos un scFv.

[illegible]

En algunas realizaciones de un anticuerpo activable multispecífico que se acopla a células T, un antígeno es típicamente un antígeno presente en la superficie de una célula tumoral u otro tipo de célula asociado con la enfermedad, tal como, pero sin limitarse a, cualquier diana enumerada en la Tabla 1, tal como, pero limitado a, EGFR, erbB2, EpCAM, Jagged, PD-L1, B7H3, o CD71 (receptor de transferrina) y otro antígeno es típicamente un estimulante (también denominado en esta invención como activador) o receptor inhibidor presente en la superficie de una célula T, célula citolítica natural (NK), célula mononuclear mieloide, macrófago y/u otra célula efectora inmunitaria, tal como, pero sin limitarse a, B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137 (también denominado TNFRSF9), CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 o VISTA. El dominio del anticuerpo que confiere especificidad al antígeno de superficie de células T también puede estar sustituido por un ligando o dominio de ligando que se une a un receptor de células T, un receptor de células NK, un receptor de macrófagos y/u otro receptor de células efectoras inmunes, tales como, pero sin limitarse a, B7-1, B7-2, B7H3, PD-L1, PD-L2 o TNFSF9. En algunas realizaciones de un anticuerpo activable dirigido a múltiples antígenos, un antígeno se selecciona de entre el grupo de dianas enumeradas en la Tabla 1, y otro antígeno se selecciona de entre el grupo de dianas enumeradas en la Tabla 1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es un anticuerpo anti-EGFR. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es C225v5, que es específico para la unión a EGFR. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es C225, que es específico para la unión a EGFR. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es C225v4, que es específico para la unión a EGFR. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es C225v6, que es específico para la unión a EGFR. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es un anticuerpo anti-Jagged. En algunas realizaciones, el

anticuerpo dirigido es 4D11, que es específico para la unión a Jagged 1 y Jagged 2 humano y de ratón. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es 4D11v2, que es específico para la unión a Jagged 1 y Jagged 2 humano y de ratón.

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido puede estar en forma de un anticuerpo activable. En algunas realizaciones, los scFv pueden estar en forma de un Pro- scFv (véase, por ejemplo, WO 2009/025846, WO 2010/081173).

- 10 En algunas realizaciones, el scFv es específico para unirse a CD3ε, y es o se deriva de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a CD3ε, por ejemplo, CH2527, FN18, H2C, OKT3, 2C11, UCHT1, o V9. En algunas realizaciones, el scFv es específico para la unión a CTLA-4 (también denominado en esta invención como CTLA y CTLA4).

- 15 En algunas realizaciones, el anti-CD3ε scFv incluye una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias que se muestran en la Tabla 7 y/o en el Ejemplo 5. En algunas realizaciones, el anti-CD3ε scFv incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en esas secuencias que se muestran en la Tabla 7 y/o en los Ejemplos 5.

- 20 En algunas realizaciones, el scFv es específico para la unión de una o más células T, una o más células NK y/o uno o más macrófagos. En algunas realizaciones, el scFv es específico para unirse a una diana seleccionada de entre el grupo que consiste en B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD 16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD 137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 o VISTA.

- 25 En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos, los anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o los anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a una diana Jagged, por ejemplo, Jagged 1 y/o Jagged 2, y que contiene una combinación de una secuencia VH CDR1, una secuencia VH CDR2 y una secuencia VH CDR3, donde al menos una de la secuencia VH CDR1, la secuencia VH CDR2 y la secuencia VH CDR3 se selecciona de entre una secuencia VH CDR1 que incluye al menos la secuencia de aminoácidos SY AMS (SEQ ID NO: 6); una secuencia VH CD2 que incluye al menos la secuencia de aminoácidos SIDPEGRQTYADSVKG (SEQ ID NO: 7); una secuencia VH CDR3 que incluye al menos la secuencia de aminoácidos DIGGRSAFDY (SEQ ID NO: 8), y combinaciones de los mismos.

- 35 En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a una diana Jagged, por ejemplo, Jagged 1 y/o Jagged 2 y que contiene una combinación de una secuencia VL CDR1, una secuencia VL CDR2 y una secuencia VL CDR3, donde al menos una de la secuencia VL CDR1, la secuencia VL CDR2 y la secuencia VL CDR3 se selecciona de entre una secuencia VL CDR1 que incluye al menos la secuencia de aminoácidos RASQSISSY (SEQ ID NO: 9); una secuencia VL CDR2 que incluye al menos la secuencia de aminoácidos AASSLQS (SEQ ID NO: 10); una secuencia VL CDR3 que incluye al menos la secuencia de aminoácidos QQTVVAPPL (SEQ ID NO: 11), y combinaciones de los mismos.

- 45 En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos conjugados activables multiespecíficos proporcionados en esta invención incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a una diana Jagged, por ejemplo, Jagged 1 y/o Jagged 2, y que contiene una combinación de una secuencia VH CDR1, una secuencia VH CDR2 y una secuencia VH CDR3, donde al menos una de la secuencia VH CDR1, la secuencia VH CDR2 y la secuencia VH CDR3 se selecciona de entre una secuencia VH CDR1 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos SY AMS. (SEQ ID NO: 6); una secuencia VH CD2 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos STDPEGRQTYADSVKG (SEQ ID NO: 7); una secuencia VH CDR3 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos DIGGRSAFDY (SEQ ID NO: 8), y combinaciones de los mismos.

- 55 En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, activables, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos multiespecíficos activables conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a una diana Jagged. por ejemplo, Jagged 1 y/o Jagged 2, y que contiene una combinación de una secuencia VL CDR1, una secuencia VL CDR2 y una secuencia VL CDR3, donde al menos una de la secuencia VL CDR1, la secuencia VL CDR2 y la secuencia VL CDR3 se selecciona de entre una secuencia VL CDR1 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos RASQSISSY (SEQ ID NO: 9); una secuencia VL CDR2 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos AASSLQS (SEQ ID NO: 10); y una secuencia VL CDR3 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %

o más idéntica a la secuencia de aminoácidos QQTVVAPPL (SEQ ID NO: 11), y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a una diana Jagged, por ejemplo, Jagged 1 y/o Jagged 2. y que contiene una combinación de una secuencia VH CDR1, una secuencia VH CDR2, una secuencia VH CDR3, una secuencia VL CDR1, una secuencia VL CDR2 y una secuencia VL CDR3, donde la secuencia VH CDR1 incluye al menos la secuencia de aminoácidos SY AMS (SEQ ID NO: 6); la secuencia VH CD2 incluye al menos la secuencia de aminoácidos SIDPEGRQTYADSVKG (SEQ ID NO: 7); la secuencia VH CDR3 incluye al menos la secuencia de aminoácidos DIGGRSAFDY (SEQ ID NO: 8); la secuencia VL CDR1 incluye al menos la secuencia de aminoácidos RASQSISSY (SEQ ID NO: 9); la secuencia VL CDR2 incluye al menos la secuencia de aminoácidos AASSLQS (SEQ ID NO: 10); y la secuencia VL CDR3 incluye al menos la secuencia de aminoácidos QQTVVAPPL (SEQ ID NO: 11).

En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a una diana Jagged, por ejemplo, Jagged 1 y/o Jagged 2. y que contiene una combinación de una secuencia VH CDR1, una secuencia VH CDR2, una secuencia VH CDR3, una secuencia VL CDR1, una secuencia VL CDR2 y una secuencia VL CDR3, donde la secuencia VH CDR1 incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos SY AMS (SEQ ID NO: 6); la secuencia VH CD2 incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos SIDPEGRQTYADSVKG (SEQ ID NO: 7); la secuencia VH CDR3 incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos DIGGRSAFDY (SEQ ID NO: 8); la secuencia VL CDR1 incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos RASQSISSY (SEQ ID NO: 9); la secuencia VL CDR2 incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos AASSLQS (SEQ ID NO: 10); y la secuencia VL CDR3 incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos QQTVVAPPL (SEQ ID NO: 11).

En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y que contiene una combinación de una secuencia VH CDR1, una secuencia VH CDR2 y una secuencia VH CDR3, donde al menos una de la secuencia VH CDR1, la secuencia VH CDR2 y la secuencia VH CDR3 se selecciona de entre una secuencia VH CDR1 que incluye al menos la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 12); una secuencia VH CD2 que incluye al menos la secuencia de aminoácidos VIWGGNTDYNTPTS (SEQ ID NO: 13); una secuencia VH CDR3 que incluye al menos la secuencia de aminoácidos ALTYDYEFAY (SEQ ID NO: 14); y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a EGFR y que contiene una combinación de una secuencia VL CDR1, una secuencia VL CDR2 y una secuencia VL CDR3, donde al menos una de las secuencia VL CDR1, la secuencia VL CDR2 y la secuencia VL CDR3 se selecciona de entre una secuencia VL CDR1 que incluye al menos la secuencia de aminoácidos RASQSIGTNIH (SEQ ID NO: 15); una secuencia VL CDR2 que incluye al menos la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 16); y una secuencia VL CDR3 que incluye al menos la secuencia de aminoácidos QQNNNWPTT (SEQ ID NO: 17) y combinaciones de los mismos. /

En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a EGFR y que contiene una combinación de una secuencia VH CDR1, una secuencia VH CDR2 y una secuencia VH CDR3, donde al menos una de la secuencia VH CDR1, la secuencia VH CDR2 y la secuencia VH CDR3 se selecciona de entre una secuencia VH CDR1 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 12); una secuencia VH CD2 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos VIWGGNTDYNTPTS (SEQ ID NO: 13); una secuencia VH CDR3 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos ALTYDYEFAY (SEQ ID NO: 14); y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos multiespecíficos conjugados que se proporcionan en esta invención incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente

a EGFR y que contiene una combinación de una secuencia VL CDR1, una secuencia VL CDR2 y una secuencia VL CDR3, donde al menos una de la secuencia VL CDR1, la secuencia VL CDR2 y la secuencia VL CDR3 se selecciona de entre una secuencia VL CDR1 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos RASQSIGTNIH (SEQ ID NO: 15); una

- 5 secuencia VL CDR2 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 16); y una secuencia VL CDR3 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos QQNNNWPTT (SEQ ID NO: 17), y combinaciones de los mismos.
- 10 En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a EGFR y que contiene una combinación de una secuencia VH CDR1, una secuencia VH CDR2, una secuencia VH CDR3, una secuencia VL CDR1, una secuencia VL CDR2 y una secuencia VL CDR3, donde la secuencia VH CDR1
- 15 incluye al menos la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 12); la secuencia VH CD2 incluye al menos la secuencia de aminoácidos VIWGGNTDYNTPTS (SEQ ID NO: 13); la secuencia VH CDR3 incluye al menos la secuencia de aminoácidos ALTYDYEFAY (SEQ ID NO: 14); la secuencia VL CDR1 incluye al menos la secuencia de aminoácidos RASQSIGTNIH (SEQ ID NO: 15); la secuencia VL CDR2 incluye al menos la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 16); y la secuencia VL CDR3 incluye al menos la secuencia de aminoácidos QQNNNWPTT (SEQ ID NO: 17).
- 20

- En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a EGFR y que contiene una combinación de una secuencia VH CDR1, una secuencia VH CDR2, una secuencia VH CDR3, una secuencia VL CDR1, una secuencia VL CDR2 y una secuencia VL CDR3, donde la secuencia VH CDR1
- 25 incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos NYGVH (SEQ ID NO: 12); la secuencia VH CD2 incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos VIWGGNTDYNTPTS (SEQ ID NO: 13); la secuencia VH CDR3 incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos ALTYDYEFAY (SEQ ID NO: 14); la secuencia VL CDR1 incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos RASQSIGTNIH (SEQ ID NO: 15); la secuencia VL CDR2 incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos KYASESIS (SEQ ID NO: 16); y la secuencia VL CDR3 incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos QQNNNWPTT (SEQ ID NO: 17).
- 30
- 35

- En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que se selecciona de entre el grupo que consiste en aquellas secuencias que se muestran en la Tabla 7 y/o en el Ejemplo 5, que incluye la Tabla 11 en la misma. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención
- 40 incluyen al menos una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que se selecciona de entre el grupo que consiste en aquellas secuencias que se muestran en la Tabla 7 y/o en el Ejemplo 5, que incluye la Tabla 11 en la misma. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que se selecciona de entre el grupo que consiste en aquellas secuencias que se muestran en la Tabla 7 y/o en el Ejemplo 5, que incluye la Tabla 11 en la misma, y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que se selecciona de entre el grupo que consiste en aquellas secuencias que se muestran en la Tabla 7 y/o en el Ejemplo 5, que incluye la Tabla 11 en la misma.
- 45
- 50

- En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias que se muestran en la Tabla 7 y/o en el Ejemplo 5, que incluye la 'tabla 11 en la misma. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados proporcionados en esta invención incluyen al menos una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en las secuencias que se muestran en la Tabla 7 y/o en el Ejemplo 5, que incluye la Tabla 11 en la misma. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos, anticuerpos multiespecíficos conjugados y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados que se proporcionan en esta invención incluyen al menos una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias que se muestran en la Tabla 7 y/o en el Ejemplo 5, que incluye la 'tabla 11 en la misma.
- 55
- 60
- 65

92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en aquellas secuencias que se muestran en la Tabla 7 y/o en el Ejemplo 5, que incluye la Tabla 11 en la misma, y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en esas secuencias que se muestran en la Tabla 7 y/o en el Ejemplo 5, que incluye la Tabla 11 en la misma.

En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico también incluye un agente conjugado con el AB. En algunas realizaciones, el agente es un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente es un agente antineoplásico. En algunas realizaciones, el agente es una toxina o fragmento de la misma. En algunas realizaciones, el agente está conjugado con el anticuerpo activable multiespecífico a través de un enlazador. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador no escindible. En algunas realizaciones, el agente es un inhibidor de microtúbulos. En algunas realizaciones, el agente es un agente que daña el ácido nucleico, tal como un alquilador de ADN o un intercalador de ADN, u otro agente que daña el ADN. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador escindible. En algunas realizaciones, el agente es un agente que se selecciona de entre el grupo enumerado en la Tabla 4. En algunas realizaciones, el agente es una dolastatina. En algunas realizaciones, el agente es una auristatina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es auristatina E o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es monometil auristatina E (MMAE). En algunas realizaciones, el agente es monometil auristatina D (MMAD). En algunas realizaciones, el agente es un maitansinoide o derivado de maitansinoide. En algunas realizaciones, el agente es DM1 o DM4. En algunas realizaciones, el agente es una duocarmicina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es una cahehcamicina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es una pirrolobenzodiazepina.

En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico también incluye un resto detectable. En algunas realizaciones, el resto detectable es un agente de diagnóstico.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico contiene naturalmente uno o más enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico puede diseñarse para incluir uno o más enlaces disulfuro.

La descripción también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo activable multiespecífico descrito en esta invención, así como vectores que incluyen estas secuencias de ácido nucleico aisladas. La descripción proporciona procedimientos para producir un anticuerpo multiespecífico cultivando una célula en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo, donde la célula comprende tal molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la célula comprende tal vector.

La descripción también proporciona anticuerpos activables multiespecíficos y/o composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos que incluyen al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a una primera diana o primer epítipo y un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana o un segundo epítipo, donde al menos el AB1 está acoplado o unido de otro modo a un resto de enmascaramiento (MM1), de modo que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a su diana. En algunas realizaciones, el MM1 se acopla a AB1 a través de una primera secuencia de resto escindible (CM1) que incluye un sustrato para una proteasa, por ejemplo, una proteasa que se colocaliza con la diana de AB1 en un sitio de tratamiento o un sitio de diagnóstico en un sujeto. Los anticuerpos activables multiespecíficos proporcionados en esta invención son estables en circulación, se activan en los sitios previstos de terapia y/o diagnóstico, pero no en tejido normal, es decir, tejido sano, y, cuando se activan, exhiben unión a la diana de AB1 que es al menos comparable al anticuerpo multiespecífico correspondiente no modificado.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable comprende un péptido de unión entre el MM1 y el CM1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico comprende un péptido de unión entre el CM1 y el AB1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable comprende un primer péptido de unión (LP1) y un segundo péptido de unión (LP2), y al menos una porción del anticuerpo activable multiespecífico tiene la disposición estructural del extremo N al extremo C de la siguiente manera en el estado no escindido: MM1-LP1-CM1-LP2-AB1 o AB1-LP2-CM1-LP1-MM1. En algunas realizaciones, los dos péptidos de unión no necesitan ser idénticos entre sí.

En algunas realizaciones, al menos uno de LP1 o LP2 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 18) y (GGGS)_n (SEQ ID NO: 19), donde n es un número entero de al menos uno. En algunas realizaciones, al menos uno de LP1 o LP2 incluye una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en GGSG (SEQ ID NO: 20), GSGGG (SEQ ID NO: 21), GSGSG (SEQ ID NO: 22), GSGGG (SEQ ID NO: 23), GGGSG (SEQ ID NO: 24), y GSSSG (SEQ ID NO: 25).

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico incluye al menos un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a una primera diana o primer epítipo y un segundo

- anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une específicamente a una segunda diana o segundo epítipo. En algunas realizaciones, cada uno de AB en el anticuerpo activable multiespecífico se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, anticuerpo de dominio, cadena simple, fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un scFv, un scAb, un dAb, un anticuerpo de cadena pesada de dominio simple y un anticuerpo de cadena ligera de dominio simple. En algunas realizaciones, cada uno de AB en el anticuerpo activable multiespecífico es un anticuerpo monoclonal de roedor (por ejemplo, ratón o rata), quimérico, humanizado o completamente humano.
- En algunas realizaciones, cada uno de los AB en el anticuerpo activable multiespecífico tiene una constante de disociación de equilibrio de alrededor de 100 nM o menos para unirse a su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones MM1 tiene una constante de disociación de equilibrio para unirse a su AB correspondiente que es mayor que la constante de disociación de equilibrio del AB a su diana o epítipo correspondiente,
- En algunas realizaciones, MM1 tiene una constante de disociación de equilibrio para unirse a su AB correspondiente que no es más que la constante de disociación de equilibrio de AB a su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, MM1 no interfiere ni compite con el AB correspondiente por unirse a la diana o epítipo correspondiente cuando el anticuerpo activable multiespecífico está en un estado escindido.
- En algunas realizaciones MM1 es un polipéptido de alrededor de 2 a 40 aminoácidos en longitud. En algunas realizaciones, cada uno de los MM en el anticuerpo activable multiespecífico es un polipéptido de no más de 40 aminoácidos en longitud.
- En algunas realizaciones, MM1 tiene una secuencia de polipéptidos que es diferente de la de la diana del AB correspondiente.
- En algunas realizaciones, MM1 tiene una secuencia de polipéptidos que no es más de un 50 % idéntica a cualquier pareja de unión natural del AB correspondiente. En algunas realizaciones MM1 tiene una secuencia de polipéptidos que no es más de un 25 % idéntica a cualquier pareja de unión natural del AB correspondiente. En algunas realizaciones MM1 tiene una secuencia de polipéptidos que no es más de un 10 % idéntica a cualquier pareja de unión natural del AB correspondiente.
- En algunas realizaciones, el acoplamiento de MM1 reduce la capacidad del AB correspondiente para unirse a su diana o epítipo de modo que la constante de disociación (K_d) del AB cuando se acopla al MM1 hacia su diana o epítipo correspondiente es al menos 20 veces mayor que el K_d del AB cuando no se acopla al MM1 hacia su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, el acoplamiento de MM1 reduce la capacidad del AB correspondiente para unirse a su diana o epítipo de modo que la constante de disociación (K_d) del AB cuando está acoplado al MM1 hacia su diana o epítipo correspondiente es al menos 40 veces mayor que el K_d del AB cuando no está acoplado al MM1 hacia su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, el acoplamiento de MM1 reduce la capacidad del AB correspondiente para unirse a su diana o epítipo de tal manera que la constante de disociación (K_d) del AB cuando se acopla al MM1 hacia su diana o epítipo correspondiente es al menos 100 veces mayor que el K_d del AB cuando no está acoplado al MM1 hacia su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, el acoplamiento de MM1 reduce la capacidad del AB correspondiente para unirse a su diana o epítipo de modo que la constante de disociación (K_d) del AB cuando se acopla al MM1 hacia su diana o epítipo correspondiente es al menos 1000 veces mayor que el K_d del AB cuando no se acopla al MM1 hacia su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, el acoplamiento de MM1 reduce la capacidad del AB correspondiente para unirse a su diana o epítipo de modo que la constante de disociación (K_d) del AB cuando está acoplado al MM1 hacia su diana o epítipo correspondiente es al menos 10.000 veces mayor que el K_d del AB cuando no está acoplado al MM I hacia su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, el MM1 es una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre MM que se muestran en los Ejemplos proporcionados en esta invención.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico incluye como mínimo un segundo resto de enmascaramiento (MM2) que inhibe la unión del AB2 a su diana cuando el anticuerpo activable multiespecífico se encuentra en un estado no escindido, y un segundo resto escindible (CM2) acoplado a la AB2, donde el CM2 es un polipéptido que funciona como sustrato para una segunda proteasa. En algunas realizaciones CM2 es un polipéptido de no más de 15 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, la segunda proteasa se colocaliza con la segunda diana o epítipo en un tejido, y donde la segunda proteasa escinde el CM2 en el anticuerpo activable multiespecífico

- cuando el anticuerpo activable multiespecífico se expone a la segunda proteasa. En algunas realizaciones, la primera proteasa y la segunda proteasa son colocadas con la primera diana o epítipo y la segunda diana o epítipo en un tejido. En algunas realizaciones, la primera proteasa y la segunda proteasa son la misma proteasa. En algunas realizaciones, CM1 y CM2 son diferentes sustratos para la misma proteasa. En algunas realizaciones, la proteasa se selecciona de entre el grupo que consiste en de los que se muestran en la Tabla 3. En algunas realizaciones, la primera proteasa y la segunda proteasa son proteasas diferentes. En algunas realizaciones, la primera proteasa y la segunda proteasa son proteasas diferentes seleccionadas de entre el grupo que consiste en las que se muestran en la Tabla 3.
- En algunas realizaciones, cada uno de los MM en el anticuerpo activable multiespecífico, por ejemplo, MM1 y al menos MM2, tiene una constante de disociación de equilibrio para unirse a su AB correspondiente que es mayor que la constante de disociación de equilibrio del AB a su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, cada uno de los MM en el anticuerpo activable multiespecífico tiene una constante de disociación de equilibrio para unirse a su AB correspondiente que no es más que la constante de disociación de equilibrio del AB a su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, cada uno de los MM en el anticuerpo activable multiespecífico no interfiere ni compete con su AB correspondiente para unirse a la diana o epítipo correspondiente cuando el anticuerpo activable multiespecífico está en un estado escindido.
- En algunas realizaciones, cada uno de los MM en el anticuerpo activable multiespecífico es un polipéptido de alrededor de 2 a 40 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, cada uno de los MM en el anticuerpo activable multiespecífico es un polipéptido de no más de 40 aminoácidos en longitud.
- En algunas realizaciones, cada uno de los MM en el anticuerpo activable multiespecífico tiene una secuencia de polipéptidos que es diferente de la diana del AB correspondiente.
- En algunas realizaciones, cada uno de los MM en el anticuerpo activable multiespecífico tiene una secuencia de polipéptidos que no es más de 50 % idéntica a cualquier pareja de unión natural del AB correspondiente. En algunas realizaciones, cada uno de los MM en el anticuerpo activable multiespecífico tiene una secuencia de polipéptidos que no es más de 25 % idéntica a cualquier pareja de unión natural del AB correspondiente. En algunas realizaciones, cada uno de los MM en el anticuerpo activable multiespecífico tiene una secuencia de polipéptidos que no es más de 10 % idéntica a cualquier pareja de unión natural del AB correspondiente.
- En algunas realizaciones, el acoplamiento de cada uno de los MM reduce la capacidad del AB correspondiente para unirse a su diana o epítipo de tal manera que la constante de disociación (K_d) del AB cuando se acopla al MM hacia su diana o epítipo correspondiente es al menos 20 veces mayor que la K_d del AB cuando no se acopla al MM hacia su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, el acoplamiento de cada uno de los MM reduce la capacidad del AB correspondiente para unirse a su diana o epítipo de manera que la constante de disociación (K_d) del AB cuando se acopla al MM hacia su diana o epítipo correspondiente es al menos 40 veces mayor que la K_d del AB cuando no se acopla al MM hacia su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, el acoplamiento de cada uno de los MM reduce la capacidad del AB correspondiente para unirse a su diana o epítipo de tal forma que la constante de disociación (K_d) del AB cuando se acopla al MM hacia su diana o epítipo correspondiente es al menos 100 veces mayor que la K_d del AB cuando no se acopla al MM hacia su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, el acoplamiento de cada uno de los MM reduce la capacidad del AB correspondiente para unirse a su diana o epítipo de tal forma que la constante de disociación (K_d) del AB cuando se acopla al MM hacia su diana o epítipo correspondiente es al menos 1000 veces mayor que la K_d del AB cuando no se acopla al MM hacia su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, el acoplamiento de cada uno de los MM reduce la capacidad del AB correspondiente para unirse a su diana o epítipo de forma que la constante de disociación (K_d) del AB cuando se acopla al MM hacia su diana o epítipo correspondiente es al menos 10.000 veces mayor que la K_d del AB cuando no se acopla al MM hacia su diana o epítipo correspondiente.
- En algunas realizaciones, cada uno de los MM es una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre un MM que se muestra en los Ejemplos proporcionados en esta invención.
- En algunas realizaciones, la proteasa que escinde la primera secuencia de resto de escisión (CM1) se coloca con la diana del AB1 en el anticuerpo activable multiespecífico en un tejido, y la proteasa escinde el CM1 en el anticuerpo activable multiespecífico cuando el anticuerpo activable multiespecífico se expone a la proteasa.

- En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico incluye más de una secuencia de resto escindible, y la proteasa que escinde al menos una secuencia de resto escindible está colocada con la diana de al menos una de las regiones AB en el anticuerpo activable multiespecífico en un tejido, y la proteasa escinde el CM en el anticuerpo activable multiespecífico cuando el anticuerpo activable multiespecífico se expone a la proteasa.
- En algunas realizaciones, cada CM, por ejemplo, CM1 y al menos CM2, se colocan en el anticuerpo activable multiespecífico de modo que en el estado no escindido, la unión del anticuerpo activable multiespecífico a una diana de una de las regiones AB se reduce para ocurrir con una constante de disociación de equilibrio que es al menos 20 veces mayor que la constante de disociación de equilibrio de un AB no modificado que se une a su diana, y mientras que en el estado escindido, el AB se une a su diana.
- En algunas realizaciones, cada CM se coloca en el anticuerpo activable multiespecífico de modo que en el estado no escindido, la unión del anticuerpo activable multiespecífico a una diana de una de las regiones AB se reduce para ocurrir con una constante de disociación de equilibrio que es al menos 40 veces mayor que la constante de disociación de equilibrio de un AB no modificado que se une a su diana, y mientras que en el estado escindido, el AB se une a su diana.
- En algunas realizaciones, cada CM se coloca en el anticuerpo activable multiespecífico de modo que en el estado no escindido, la unión del anticuerpo activable multiespecífico a una diana de una de las regiones AB se reduce para ocurrir con una constante de disociación de equilibrio que es al menos 50 veces mayor que la constante de disociación de equilibrio de un AB no modificado que se une a su diana, y mientras que en el estado escindido, el AB se une a su diana.
- En algunas realizaciones, cada CM se coloca en el anticuerpo activable multiespecífico de modo que en el estado no escindido, la unión del anticuerpo activable multiespecífico a una diana de una de las regiones AB se reduce para ocurrir con una constante de disociación de equilibrio que es al menos 100 veces mayor que la constante de disociación de equilibrio de un AB no modificado que se une a su diana, y mientras que en el estado escindido, el AB se une a su diana.
- En algunas realizaciones, cada CM se coloca en el anticuerpo activable multiespecífico de modo que en el estado no escindido, la unión del anticuerpo activable multiespecífico a una diana de una de las regiones AB se reduce para ocurrir con una constante de disociación de equilibrio que es al menos 200 veces mayor que la constante de disociación de equilibrio de un AB no modificado que se une a su diana, y mientras que en el estado escindido, el AB se une a su diana.
- En algunas realizaciones, cada CM en el anticuerpo activable multiespecífico es un polipéptido de hasta 15 aminoácidos de longitud.
- En algunas realizaciones, al menos un CM en el anticuerpo activable multiespecífico incluye la secuencia de aminoácidos LSGRSDNH (SEQ ID NO: 26). En algunas realizaciones, al menos un resto escindible se selecciona para su uso con una proteasa específica, por ejemplo, una proteasa que se sabe que se coloca con por lo menos una diana del anticuerpo activable multiespecífico. Por ejemplo, restos escindibles adecuados para su uso en los anticuerpos activables multiespecíficos de la descripción se escinden mediante al menos una proteasa tal como uroquinasa, legumaina y/o matriptasa (también denominada en esta invención MT-SP1 o MTSP1). En algunas realizaciones, un resto escindible adecuado incluye al menos una de las siguientes secuencias: TGRGPSWV (SEQ ID NO: 27); SARGPSRW (SEQ ID NO: 28); TARGPSFK (SEQ ID NO: 29); LSGRSDNH (SEQ ID NO: 26); GGWHTGRN (SEQ ID NO: 30); HTGRSGAL (SEQ ID NO: 31); PLTGRSGG (SEQ ID NO: 32); AARGPAIH (SEQ ID NO: 33); RGPANPM (SEQ ID NO: 34); SSRGPAYL (SEQ ID NO: 35); RGPATPIM (SEQ ID NO: 36); RGA (SEQ ID NO: 37); GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 38); FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 39); VHMLPLGLP (SEQ ID NO: 40); SPLTGRSG (SEQ ID NO: 41); SAGFSLPA (SEQ ID NO: 42); LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 43); SGGPLGVR (SEQ ID NO: 44); y/o PLGL (SEQ ID NO: 45).
- En algunas realizaciones, cada CM en el anticuerpo activable multiespecífico es un sustrato para una proteasa que se selecciona de entre el grupo que consiste en las que se muestran en la Tabla 3. En algunas realizaciones, la proteasa se selecciona de entre el grupo que consiste en uPA, legumaina, MT-SP1, ADAM 17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, elastasa de neutrófilos, MMP-7, MMP-9, MMP-12, MMP-13 y MMP-14. En algunas realizaciones, la proteasa es una cathepsina, tal como, de modo no taxativo, cathepsina S. En algunas realizaciones, cada CM en el anticuerpo activable multiespecífico es un sustrato para una proteasa seleccionada de entre el grupo que consiste en uPA (activador de plasminógeno de uroquinasa), legumaina y MT-SP1 (matriptasa). En algunas realizaciones, la proteasa comprende uPA. En algunas realizaciones, la proteasa comprende legumaina. En algunas realizaciones, la proteasa comprende MT-SP1. En algunas realizaciones, la proteasa comprende una metaloproteínasa de matriz (MMP).
- En algunas realizaciones, al menos un CM en el anticuerpo activable multiespecífico es un sustrato para al menos dos proteasas. En algunas realizaciones, cada proteasa se selecciona de entre el grupo que consiste en los que se muestran en la Tabla 3. En algunas realizaciones, al menos un CM en el anticuerpo activable multiespecífico es un

sustrato para al menos dos proteasas, donde una de las proteasas se selecciona de entre el grupo que consiste en uPA, legumaina y MT-SP1 y la otra proteasa se selecciona de entre el grupo que consiste en las que se muestran en la Tabla 3. En algunas realizaciones, al menos un CM en el anticuerpo activable multiespecífico es un sustrato para al menos dos proteasas seleccionadas de entre el grupo que consiste en uPA, legumaina y MT-SP1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable incluye al menos un primer CM (CM1) y un segundo CM (CM2). En algunas realizaciones, CM1 y CM2 son parte de un único enlazador escindible que une un MM a un AB en algunas realizaciones. CM1 es parte de un enlazador escindible que une MM1 a AB1, y CM2 es parte de un enlazador escindible separado que une un MM2 a AB2. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico comprende más de dos CM. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo activable multiespecífico comprende más de dos CM y más de dos MM. En algunas realizaciones, cada CM1 y CM2 son polipéptidos de no más de 15 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, al menos uno del primer CM y el segundo CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa seleccionada de entre el grupo que consiste en aquellas listadas en la Tabla 3. En algunas realizaciones, al menos uno del primer CM y el segundo CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa seleccionada de entre el grupo que consiste en uPA, legumaina y MT-SP1. En algunas realizaciones, el primer CM se escinde por un primer agente de escisión seleccionado de entre el grupo que consiste en uPA, legumaina y MT-SP1 en un tejido diana, y el segundo CM se escinde por un segundo agente de escisión en un tejido diana. En algunas realizaciones, la otra proteasa se selecciona de entre el grupo que consiste en aquellas que se muestran en la Tabla 3. En algunas realizaciones, el primer agente de escisión y el segundo agente de escisión son la misma proteasa seleccionada de entre el grupo que consiste en los mencionados en la Tabla 3, y el primer CM y el segundo CM son diferentes sustratos para la enzima. En algunas realizaciones, el primer agente de escisión y el segundo agente de escisión son la misma proteasa seleccionada de entre el grupo que consiste en uPA, legumaina y MT-SP1 y el primer CM y el segundo CM son diferentes sustratos para la enzima. En algunas realizaciones, el primer agente de escisión y el segundo agente de escisión son la misma proteasa seleccionada de entre el grupo que consiste en las mostradas en la Tabla 3. En algunas realizaciones, el primer agente de escisión y el segundo agente de escisión son proteasas diferentes. En algunas realizaciones, el primer agente de escisión y el segundo agente de escisión son proteasas diferentes. En algunas realizaciones, el primer agente de escisión y el segundo agente de escisión son diferentes proteasas seleccionadas de entre el grupo que consiste en las que se muestran en la Tabla 3. En algunas realizaciones, el primer agente de escisión y el segundo agente de escisión se colocan en el tejido diana. En algunas realizaciones, el primer CM y el segundo CM se escinden por al menos un agente de escisión en el tejido diana.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico se expone y se escinde por una proteasa de modo que, en el estado activado o escindido, el anticuerpo activable multiespecífico activado incluye una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que incluye al menos una porción de LP2 y/o una secuencia CM después de que la proteasa haya escindido el CM.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico también incluye un péptido señal. En algunas realizaciones, el péptido señal se conjuga con el anticuerpo activable multiespecífico a través de un espaciador. En algunas realizaciones, el espaciador se conjuga con el anticuerpo activable multiespecífico en ausencia de un péptido señal. En algunas realizaciones, el espaciador se une directamente a al menos uno de los MM del anticuerpo activable multiespecífico.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico en un estado no escindido comprende un espaciador que se une directamente a un primer MM y tiene la disposición estructural desde el extremo N hasta el extremo C del espaciador-MM1-CM-AB1. En algunas realizaciones, el espaciador incluye al menos la secuencia de aminoácidos QGQSGQ (SEQ ID NO: 46).

En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es mayor que la del anticuerpo multiespecífico correspondiente; por ejemplo, la pK del anticuerpo activable multiespecífico es mayor que la del anticuerpo multiespecífico correspondiente. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es similar a la del anticuerpo multiespecífico correspondiente. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 15 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 12 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 11 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 10 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 9 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 8 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 7 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 6 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 5 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 4 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 3 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en

suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 2 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 24 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 20 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 18 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 16 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 14 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 12 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 10 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 8 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 6 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 4 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 3 horas cuando se administra a un organismo.

La descripción también proporciona composiciones y procedimientos que incluyen un anticuerpo activable multiespecífico que incluye al menos un primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB1) que se une específicamente a una diana y un segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB2), donde al menos el primer AB en el anticuerpo activable multiespecífico está acoplado a un resto de enmascaramiento (MM1) que disminuye la capacidad de AB1 para unirse a su diana. En algunas realizaciones, cada AB está acoplado a un MM que disminuye la capacidad de su AB correspondiente a cada diana. Por ejemplo, en realizaciones de anticuerpos activables biespecíficos AB1 está acoplado a un primer resto de enmascaramiento (MM1) que disminuye la capacidad de AB1 para unirse a su diana, y AB2 está acoplado a un segundo resto de enmascaramiento (MM2) que disminuye la capacidad de AB2 para unirse a su diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico comprende más de dos regiones AB; en tales realizaciones, AB1 está acoplado a un primer resto de enmascaramiento (MM1) que disminuye la capacidad de AB1 para unirse a su diana, AB2 está acoplado a un segundo resto de enmascaramiento (MM2) que disminuye la capacidad de AB2 para unirse a su diana, AB3 está acoplado a un tercer resto de enmascaramiento (MM3) que disminuye la capacidad de AB3 para unirse a su diana, y así sucesivamente para cada AB en el anticuerpo activable multiespecífico.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico incluye además al menos un resto escindible (CM) que es un sustrato para una proteasa, donde el CM une un MM a un AB. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico incluye al menos un primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB1) que se une específicamente a una diana y un segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB2), donde al menos el primer AB en el anticuerpo activable multiespecífico se acopla a través de un primer resto escindible (CM1) a un resto de enmascaramiento (MM1) que disminuye la capacidad de AB1 para unirse a su diana. En algunas realizaciones de anticuerpos activables biespecíficos, AB1 está acoplado a través de CM1 a MM1, y AB2 está acoplado a través de un segundo resto escindible (CM2) a un segundo resto de enmascaramiento (MM2) que disminuye la capacidad de AB2 para unirse a su diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico comprende más de dos regiones AB; en algunas de estas realizaciones, AB1 está acoplado a través de CM1 a MM1, AB2 está acoplado a través de CM2 a MM2, y AB3 está acoplado a través de un tercer resto escindible (CM3) a un tercer resto de enmascaramiento (MM3) que disminuye la capacidad de AB3 para unirse a su diana, y así sucesivamente para cada AB en el anticuerpo activable multiespecífico.

Las composiciones y procedimientos proporcionados en esta invención permiten la unión de uno o más agentes a uno o más residuos de cisteína en cualquiera de las regiones AB sin comprometer la actividad (por ejemplo, el enmascaramiento, la activación o la actividad de unión) del anticuerpo activable multiespecífico. En algunas realizaciones, las composiciones y procedimientos proporcionados en esta invención permiten la unión de uno o más agentes a uno o más residuos de cisteína en cualquiera de las regiones AB sin reducir o alterar de otro modo uno o más enlaces disulfuro dentro de cualquiera de los MM. Las composiciones y procedimientos proporcionados en esta invención producen un anticuerpo activable multiespecífico que se conjuga con uno o más agentes, por ejemplo, cualquiera de una diversidad de agentes terapéuticos, de diagnóstico y/o profilácticos, preferiblemente sin ninguno de los agentes que se conjugan con cualquiera de los MM del anticuerpo activable multiespecífico. Las composiciones y los procedimientos proporcionados en esta invención producen anticuerpos activables multiespecíficos conjugados en los que cada uno de los MM conserva la capacidad de enmascarar efectiva y eficientemente su AB correspondiente del anticuerpo activable multiespecífico en un estado no escindido. Las composiciones y procedimientos proporcionados en esta invención producen anticuerpos activables multiespecíficos conjugados en los que el anticuerpo activable todavía está activado, es *decir*, escindido, en presencia de una proteasa que puede escindir el CM.

Los anticuerpos activables multiespecíficos tienen al menos un punto de conjugación para un agente, pero en los procedimientos y composiciones proporcionados en esta invención, menos que todos los posibles puntos de conjugación están disponibles para la conjugación con un agente. En algunas realizaciones, el uno o más puntos de conjugación son átomos de azufre implicados en enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, el uno o más puntos de

conjugación son átomos de azufre implicados en enlaces disulfuro intercadena. En algunas realizaciones, el uno o más puntos de conjugación son átomos de azufre implicados en enlaces sulfuro intercadena, pero no átomos de azufre implicados en enlaces disulfuro intracadena. En algunas realizaciones, el uno o más puntos de conjugación son átomos de azufre de cisteína u otros residuos de aminoácidos que contienen un átomo de azufre. Dichos residuos pueden aparecer de forma natural en la estructura del anticuerpo o pueden incorporarse al anticuerpo mediante mutagénesis dirigida a sitio, conversión química, o mala incorporación de aminoácidos no naturales.

También se proporcionan procedimientos para preparar un conjugado de un anticuerpo activable multiespecífico que tiene uno o más enlaces disulfuro intercadena en uno o más del AB y uno o más enlaces disulfuro intracadena en el MM correspondiente, y se proporciona un fármaco reactivo con tioles libres. El procedimiento generalmente incluye la reducción parcial de enlaces disulfuro intercadena en el anticuerpo activable con un agente reductor, tal como, por ejemplo, TCEP; y conjugar el reactivo farmacológico con tioles libres con el anticuerpo activable parcialmente reducido. Como se usa en esta invención, el término reducción parcial se refiere a situaciones donde un anticuerpo activable multiespecífico se pone en contacto con un agente reductor y se reducen menos de todos los enlaces disulfuro, *por ejemplo*, menos de todos los sitios posibles de conjugación. En algunas realizaciones, menos de 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o menos de 5 % de todos los posibles sitios de conjugación son reducidos.

En otras realizaciones más, se proporciona un procedimiento para reducir y conjugar un agente, por ejemplo, un fármaco, con un anticuerpo activable multiespecífico que da como resultado selectividad en la colocación del agente. El procedimiento generalmente incluye la reducción parcial del anticuerpo activable multiespecífico con un agente reductor de manera que cualquiera de los sitios de conjugación en el resto de enmascaramiento u otra porción no AB del anticuerpo activable no se reduzca, y la conjugación del agente con tioles intercadena en una o más de las regiones AB del anticuerpo activable multiespecífico. El uno o más sitios de conjugación se seleccionan para permitir el posicionamiento deseado de un agente para permitir que la conjugación se produzca en un sitio deseado. El agente reductor es, por ejemplo, TCEP. Las condiciones de reacción de reducción, tales como, por ejemplo, la relación de un agente reductor con respecto a un anticuerpo activable, la duración de la incubación, la temperatura durante la incubación, el pH de la solución de reacción de reducción, etc., se determinan identificando las condiciones que producen un anticuerpo activable conjugado en el que el MM conserva la capacidad de enmascarar efectiva y eficientemente el AB del anticuerpo activable en un estado no escindido. La relación del agente de reducción con respecto al anticuerpo activable multiespecífico variará dependiendo del anticuerpo activable. En algunas realizaciones, la relación de agente reductor con respecto a anticuerpo activable multiespecífico estará en un intervalo de aproximadamente 20:1 a 1:1, de aproximadamente 10:1 a 1:1, de aproximadamente 9:1 a 1:1, de aproximadamente 8:1 a 1:1, de aproximadamente 7:1 a 1:1, de aproximadamente 6:1 a 1:1, de aproximadamente 5:1 a 1:1, de aproximadamente 4:1 a 1:1, de aproximadamente 3:1 a 1:1, de aproximadamente 2:1 a 1:1, de aproximadamente 20:1 a 1:1,5, de aproximadamente 10:1 a 1:1,5, de aproximadamente 9:1 a 1:1,5, de aproximadamente 8:1 a 1:1,5, de aproximadamente 7:1 a 1:1,5, de aproximadamente 6:1 a 1:1,5, de aproximadamente 5:1 a 1:1,5, de aproximadamente 4:1 a 1:1,5, de aproximadamente 3:1 a 1:1,5, de aproximadamente 2:1 a 1:1,5, de aproximadamente 1,5:1 a 1:1,5, o de aproximadamente 1:1 a 1:1,5. En algunas realizaciones la relación está en el intervalo de aproximadamente 5:1 a 1:1. En algunas realizaciones, la relación está en un intervalo de aproximadamente 5:1 a 1,5:1. En algunas realizaciones, la relación está en un intervalo de aproximadamente 4:1 a 1:1. En algunas realizaciones, la relación está en un intervalo de aproximadamente 4:1 a 1,5:1. En algunas realizaciones, la relación está en un intervalo de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 1:1. En algunas realizaciones, la relación está en un intervalo de aproximadamente 2,5:1 a 1:1.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento para reducir los enlaces disulfuro intercadena en una o más de las regiones AB de un anticuerpo activable multiespecífico y conjugar un agente, por ejemplo, un agente que contiene tiol tal como un fármaco, con los tioles intercadena resultantes para localizar selectivamente uno o más agentes en el AB. El procedimiento generalmente incluye reducir parcialmente una o más de las regiones AB con un agente reductor para formar al menos dos tioles intercadena sin formar todos los tioles intercadena posibles en el anticuerpo activable; y conjugar el agente con los tioles intercadena del AB parcialmente reducido. Por ejemplo, una o más de las regiones AB del anticuerpo activable multiespecífico se reduce parcialmente durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 37 °C en una relación deseada de agente reductor: anticuerpo activable. En algunas realizaciones, la relación de agente reductor con respecto a anticuerpo activable estará en un intervalo de aproximadamente 20:1 a 1:1, de aproximadamente 10:1 a 1:1, de aproximadamente 9:1 a 1:1, de aproximadamente 8:1 a 1:1, de aproximadamente 7:1 a 1:1, de aproximadamente 6:1 a 1:1, de aproximadamente 5:1 a 1:1, de aproximadamente 4:1 a 1:1, de aproximadamente 3:1 a 1:1, de aproximadamente 2:1 a 1:1, de aproximadamente 20:1 a 1:1,5, de aproximadamente 10:1 a 1:1,5, de aproximadamente 9:1 a 1:1,5, de aproximadamente 8:1 a 1:1,5, de aproximadamente 7:1 a 1:1,5, de aproximadamente 6:1 a 1:1,5, de aproximadamente 5:1 a 1:1,5, de aproximadamente 4:1 a 1:1,5, de aproximadamente 3:1 a 1:1,5, de aproximadamente 2:1 a 1:1,5, de aproximadamente 1,5:1 a 1:1,5, o de aproximadamente 1:1 a 1:1,5. En algunas realizaciones, la relación está en un intervalo de aproximadamente 5:1 a 1:1. En algunas realizaciones, la relación está en un intervalo de aproximadamente 5:1 a 1,5:1. En algunas realizaciones, la relación está en un intervalo de aproximadamente 4:1 a 1:1. En algunas realizaciones, la relación está en un intervalo de aproximadamente 4:1 a 1,5:1. En algunas realizaciones, la relación está en un intervalo de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 1:1. En algunas realizaciones, la relación está en un intervalo de aproximadamente 2,5:1 a 1:1.

El reactivo que contiene tiol puede ser, por ejemplo, cisteína o N-acetilcisteína. El agente reductor puede ser, por ejemplo, TCEP. En algunas realizaciones, el anticuerpo activable reducido puede purificarse antes de la conjugación, usando, por ejemplo, cromatografía en columna, diálisis o diafiltración. Alternativamente, el anticuerpo reducido no se purifica después de la reducción parcial y antes de la conjugación.

La descripción también proporciona anticuerpos activables multiespecíficos parcialmente reducidos en los que al menos un enlace disulfuro intercadena en el anticuerpo activable multiespecífico se ha reducido con un agente reductor sin alterar ningún enlace disulfuro intracadena en el anticuerpo activable multiespecífico, donde el anticuerpo activable multiespecífico incluye al menos un primer anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une específicamente a la diana, un primer resto de enmascaramiento (MM1) que inhibe la unión del ABI del anticuerpo activable multiespecífico en un estado no escindido a la diana, un primer resto escindible (CM1) acoplado al AB1, donde el CM1 es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa, y un segundo anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une específicamente a una segunda diana. En algunas realizaciones, el MM1 está acoplado al AB1 a través del CM1. En algunas realizaciones, uno o más enlaces disulfuro intracadena del anticuerpo activable multiespecífico no se alteran por el agente reductor. En algunas realizaciones, uno o más enlaces disulfuro intracadena del MM1 en el anticuerpo activable multiespecífico no se alteran por el agente reductor. En algunas realizaciones, el agente reductor es TCEP.

En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos descritos en esta invención se utilizan junto con uno o más agentes adicionales o una combinación de agentes adicionales. Agentes adicionales adecuados incluyen terapias farmacéuticas y/o quirúrgicas actuales para una aplicación prevista, tal como, por ejemplo, cáncer. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos y/o los anticuerpos activables multiespecíficos se pueden utilizar junto con un agente quimioterapéutico o agente anti-neoplásico.

En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico y el agente adicional se formulan en una única composición terapéutica, y el anticuerpo multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico y el agente adicional se administran simultáneamente. De manera alternativa, el anticuerpo multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico y el agente adicional están separados entre sí, *por ejemplo*, cada uno se formula en una composición terapéutica separada, y el anticuerpo multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico y el agente adicional se administran simultáneamente, o el anticuerpo multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico y el agente adicional se administran en diferentes momentos durante el régimen de tratamiento. Por ejemplo, el anticuerpo multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico se administra antes de la administración del agente adicional, el anticuerpo multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico se administra después de la administración del agente adicional, o el anticuerpo multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico y el agente adicional se administran de manera alterna. Tal como se describe en esta invención, el anticuerpo anti-multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico y el agente adicional se administran en dosis únicas o en dosis múltiples.

La descripción también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo activable multiespecífico descrito en esta invención, así como vectores que incluyen estas secuencias de ácido nucleico aisladas. La descripción proporciona procedimientos para producir un anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico cultivando una célula en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico, donde la célula comprende tal molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la célula comprende tal vector.

La descripción también proporciona un procedimiento para fabricar anticuerpos multiespecíficos de la descripción y/o anticuerpos activables multiespecíficos de la descripción mediante (a) el cultivo de una célula que comprende una construcción de ácido nucleico que codifica el anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico, y (b) la recuperación del anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico.

La presente descripción también proporciona procedimientos para tratar, prevenir, retrasar la progresión o mejorar de otro modo un síntoma de una o más patologías o aliviar un síntoma asociado con dichas patologías, mediante la administración de un anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico de la descripción a un sujeto en el que se desea dicho tratamiento o prevención. El sujeto a tratar es, *por ejemplo*, humano u otro mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano, tal como un primate no humano, un animal de compañía (por ejemplo, gato, perro, caballo), animal de granja, animal de trabajo o animal de zoológico. En algunas realizaciones, el sujeto es un roedor.

La presente descripción también proporciona procedimientos para inducir la activación y destrucción de células T dependientes de la diana de una célula diana mediante la administración de un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción a un sujeto en el que se desea dicha inducción, donde cuando el anticuerpo activable multiespecífico se encuentra en el estado escindido, por ejemplo, cada resto de enmascaramiento en el anticuerpo activable multiespecífico ya no se une o se asocia de otro modo con el dominio AB correspondiente, se produce la activación y destrucción de células T dependientes de la diana de la célula diana, y cuando el anticuerpo activable multiespecífico

se encuentra en el estado no escindido, por ejemplo, al menos un resto de enmascaramiento del anticuerpo activable multiespecífico se une o se asocia de otro modo con el dominio AB correspondiente, la activación y destrucción de células T dependientes de la diana de la célula diana se reduce o se inhibe de otro modo. Cualquiera de los anticuerpos activables multiespecíficos descritos en esta invención son adecuados para su uso en dichos procedimientos. El sujeto a ser tratado, *p.ej.*, es un humano u otro mamífero. En algunas realizaciones el sujeto es un mamífero no humano, tal como un primate no humano, un animal de compañía (por ejemplo, gato, perro, caballo), animal de granja, animal de trabajo o animal de zoológico. En algunas realizaciones, el sujeto es un roedor.

Un anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico utilizado en cualquiera de las realizaciones de estos procedimientos y usos se puede administrar en cualquier etapa de la enfermedad y/o cualquier etapa en la que se desee la activación y destrucción con células T de una célula diana. Por ejemplo, dicho anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico se puede administrar a un paciente que padece cáncer en cualquier etapa, desde temprano hasta metastásico. Los términos sujeto y paciente se usan indistintamente en esta invención. Un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico utilizado en cualquiera de las realizaciones de estos procedimientos y usos se puede utilizar en un régimen de tratamiento que comprende terapia neoadyuvante. Un anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico utilizado en cualquiera de las realizaciones de estos procedimientos y usos puede administrarse solo o en combinación con uno o más agentes adicionales, que incluyen inhibidores de molécula pequeña, otras terapias basadas en anticuerpos, terapias basadas en polipéptidos o péptidos, terapias basadas en ácido nucleico y/u otras biología.

La descripción proporciona procedimientos para usar los anticuerpos y/o anticuerpos activables en una diversidad de indicaciones de diagnóstico y/o profilácticas. Por ejemplo, la descripción proporciona procedimientos y kits para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión y una diana de interés en un sujeto o una muestra (i) poniendo en contacto un sujeto o muestra con un anticuerpo activable multiespecífico que incluye al menos un primer resto de enmascaramiento (MM1), un primer resto escindible (CM1) que se escinde por el agente de escisión, y al menos un dominio de unión a antígeno o fragmento del mismo (AB1) que se une específicamente a la diana de interés, y un segundo dominio de unión a antígeno o fragmento del mismo (AB2) que se une específicamente a una segunda diana y/o a un segundo epítipo, (a) donde el MM1 es un péptido que inhibe la unión del AB1 a la diana, y donde el MM1 no tiene una secuencia de aminoácidos de una pareja de unión de origen natural del AB1 y no es una forma modificada de una pareja de unión natural del AB1; y (b) donde, en un estado no escindido y no activado, el MM1 interfiere con la unión específica del AB1 a la diana, y en un estado activado escindido, el MM1 no interfiere ni compete con la unión específica del AB1 a la diana; y (ii) medir un nivel de anticuerpo activable multiespecífico activado en el sujeto o muestra, donde un nivel detectable de anticuerpo activable multiespecífico activado en el sujeto o muestra indica que el agente de escisión y la diana están presentes en el sujeto o muestra, y donde el nivel no detectable de anticuerpo activable multiespecífico activado en el sujeto o muestra indica que el agente de escisión, la diana o tanto el agente de escisión como la diana están ausentes y/o no están suficientemente presentes en el sujeto o la muestra.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico es un anticuerpo activable multiespecífico con el que se conjuga un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico no se conjuga con un agente. En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico comprende un marcador detectable. En algunas realizaciones, el marcador detectable se posiciona en el AB1. En algunas realizaciones, la medición del nivel de anticuerpo activable multiespecífico en el sujeto o muestra se realiza usando un reactivo secundario que se une específicamente al anticuerpo activable activado multiespecífico, donde el reactivo comprende un marcador detectable. En algunas realizaciones, el reactivo secundario es un anticuerpo que comprende un marcador detectable.

En algunas realizaciones de estos procedimientos y kits, el anticuerpo activable multiespecífico incluye un marcador detectable. En algunas realizaciones de estos procedimientos y kits, el marcador detectable incluye un agente de imagenología, un agente de contraste, una enzima, un marcador fluorescente, un cromóforo, un colorante, uno o más iones metálicos, o un marcador basado en ligando. En algunas realizaciones de estos procedimientos y kits, el agente de imagenología comprende un radioisótopo. En algunas realizaciones de estos procedimientos y kits, el radioisótopo es indio o tecnecio. En algunas realizaciones de estos procedimientos y kits, el agente de contraste comprende yodo, gadolinio u óxido de hierro. En algunas realizaciones de estos procedimientos y kits, la enzima comprende peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o β -galactosidasa. En algunas realizaciones de estos procedimientos y kits, el marcador fluorescente comprende proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CEP), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja modificada (mRFP), proteína fluorescente roja tdimer2 (RFP tdimer2), HCRED, o un derivado de europio. En algunas realizaciones de estos procedimientos y kits, el marcador luminiscente comprende un derivado de N-metilacridio. En algunas realizaciones de estos procedimientos, el marcador comprende un marcador Alexa Fluor®, tal como Alex Fluor® 680 o Alexa Fluor® 750. En algunas realizaciones de estos procedimientos y kits, el marcador basada en ligando comprende biotina, avidina, estreptavidina o uno o más haptenos.

En algunas realizaciones de estos procedimientos y kits, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones de estos procedimientos y kits, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano, tal como un primate no humano, un animal de compañía (por ejemplo, gato, perro, caballo), animal de granja, animal de trabajo o animal de zoológico. En algunas realizaciones, el sujeto es un roedor.

En algunas realizaciones de estos procedimientos, el procedimiento es un procedimiento *in vivo*. En algunas

realizaciones de estos procedimientos, el procedimiento es un procedimiento *in situ*. En algunas realizaciones de estos procedimientos, el procedimiento es un procedimiento *ex vivo*. En algunas realizaciones de estos procedimientos, el procedimiento es un procedimiento *in vitro*.

5 En algunas realizaciones de los procedimientos y kits, el procedimiento o kit se usa para identificar o reajustar de otro modo una población de pacientes adecuada para el tratamiento con un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción. Por ejemplo, los pacientes que dan positivo tanto para la diana como para una proteasa que escinde el sustrato en el primer resto escindible (CM1) del anticuerpo activable multiespecífico que se está ensayando en estos procedimientos se identifican como candidatos adecuados para el tratamiento con tal anticuerpo activable multiespecífico que comprende tal CM1. Asimismo, los pacientes que den negativo tanto para la diana como para la proteasa que escinde el sustrato en el CM1 en el anticuerpo activable multiespecífico que se ensaya usando estos procedimientos podrían identificarse como candidatos adecuados para otra forma de terapia.

15 En algunas realizaciones, se usa un procedimiento o kit para identificar o reajustar de otro modo una población de pacientes adecuada para el tratamiento con un anticuerpo activable multiespecífico y/o un anticuerpo activable conjugado multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo activable multiespecífico con el que se conjuga un agente terapéutico) de la descripción, seguido de tratamiento mediante la administración de ese anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico conjugado a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, los pacientes que dan positivo tanto para la diana como para una proteasa que escinde el sustrato en el primer resto escindible (CM1) del anticuerpo activable multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico conjugado que se ensaya en estos procedimientos se identifican como candidatos adecuados para el tratamiento con un anticuerpo activable multiespecífico tal como y/o tal anticuerpo activable conjugado que comprende tal CM1, y a continuación se administra al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo activable multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico conjugado que se ensayó. Asimismo, los pacientes que den negativo para cualquiera de o tanto la diana como la proteasa que escinde el sustrato en el CM1 en el anticuerpo activable multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico conjugado que se ensaya usando estos procedimientos podrían identificarse como candidatos adecuados para otra forma de terapia.

30 En algunas realizaciones, dichos pacientes pueden analizarse con otro anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico conjugado hasta que se identifique un anticuerpo adecuado multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico conjugado para el tratamiento, por ejemplo, un anticuerpo activable multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico conjugado que comprende un CM que se escinde por el paciente en el sitio de enfermedad. En algunas realizaciones, al paciente se le administra a continuación una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo activable multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico conjugado para el que el paciente dio positivo.

35 Composiciones farmacéuticas según la descripción pueden incluir un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción y un vehículo. Estas composiciones farmacéuticas pueden incluirse en kits, tales como, por ejemplo, kits de diagnóstico.

40 Un experto en la materia apreciará que los anticuerpos de la divulgación tienen una variedad de usos. Por ejemplo, las proteínas de la descripción se utilizan como agentes terapéuticos para una variedad de trastornos. Los anticuerpos de la descripción también se utilizan como reactivos en kits de diagnóstico o como herramientas de diagnóstico, o estos anticuerpos se pueden utilizar en ensayos de competencia para generar reactivos terapéuticos.

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una ilustración que representa varios formatos de anticuerpos biespecíficos (adaptados de Chan y Carter, Nat. Rev. Immunol. 2010).

50 Las Figuras 2A-2C son una serie de ilustraciones que representan varios formatos de anticuerpos multiespecíficos adecuados para su uso en las composiciones y procedimientos de la descripción. En un anticuerpo biespecífico, un scFv puede fusionarse al extremo carboxilo de la cadena pesada (Hc) de un anticuerpo de IgG (Figura 2A); al extremo carboxilo de la cadena ligera (Lc) (Figura 2B); o al extremo carboxilo de tanto la cadena pesada como ligera. (Figura 2C). La Figura 2D es un diagrama de una única construcción genética para la expresión de fusiones de anticuerpos multiespecíficos.

60 La Figura 3A es una serie de ilustraciones que representan varios formatos de anticuerpos activables adecuados para su uso en las composiciones y procedimientos de la descripción. La Figura 3B es un diagrama de construcciones genéticas para la expresión de fusiones de anticuerpos activables multiespecíficos.

En la Figura 4, los paneles A-J, son una serie de diagramas esquemáticos de un conjunto seleccionado de las permutaciones posibles de anticuerpos multiespecíficos de la descripción. Las casillas sombreadas en gris cubren las configuraciones representadas en la Figura 2 y son incluidas aquí para completitud y comparación.

65 En la Figura 5, los Paneles A-J. son una serie de diagramas esquemáticos de un conjunto seleccionado de las

permutaciones posibles de anticuerpos activables multiespecíficos de la descripción. Las casillas sombreadas en gris cubren las configuraciones representadas en la Figura 3 y el son incluidas aquí para completitud y comparación. En particular, esta figura muestra anticuerpos activables multiespecíficos en los que el sitio de unión al antígeno primario está enmascarado (es decir, activable) y los dominios de unión al antígeno adicionales no están enmascarados.

5 En la Figura 6, los Paneles A-J, son una serie de diagramas esquemáticos de una matriz de anticuerpos activables multiespecíficos en los que todos los dominios de unión al antígeno están enmascarados.

10 En la Figura 7, Los paneles A-J. son una serie de diagramas esquemáticos de un conjunto de anticuerpos activables multiespecíficos en los que el dominio de unión al antígeno secundario está enmascarado y los dominios de unión al antígeno adicionales no están enmascarados.

15 En la Figura 8, los Paneles A-J, son una serie de diagramas esquemáticos de una matriz de anticuerpos activables multiespecíficos en los que la mayoría, pero no todos los dominios de unión al antígeno están enmascarados y al menos un dominio de unión al antígeno adicionales no está enmascarado.

20 En la Figura 9, los Paneles A-D son una serie de diagramas esquemáticos de una matriz de anticuerpos activables multiespecíficos en los que el dominio de unión al antígeno primario y otro dominio de unión al antígeno están enmascarados, y el o los dominios de unión al antígeno restantes no están enmascarados.

La Figura 10 es una fotografía que representa el análisis PAGE de anticuerpos multiespecíficos y anticuerpos activables multiespecíficos que demuestran los pesos moleculares de las cadenas pesadas fusionadas con scFv, muestras 1-8, en comparación con los respectivos anticuerpos monoespecíficos o anticuerpos activables, muestras 9-11.

25 La Figura 11 es un gráfico que representa la capacidad de los anticuerpos multiespecíficos para unirse específicamente a sus antígenos cognados.

30 Las Figuras 12A-12B son una serie de gráficos que representan la capacidad de los anticuerpos multiespecíficos y los anticuerpos activables multiespecíficos que incluyen scFv CTLA-4 anti -humano para unirse específicamente a (A) CTLA-4 de ratón y (B) humano.

35 La Figura 13 es un gráfico que representa la capacidad de los anticuerpos activables multiespecíficos que contienen OKT3 denominados en esta invención anticuerpo activable multiespecífico anti-EGFR 3954-1204-C225v5-OKT3 y anticuerpo activable multiespecífico anti-Jagged 5342-1204-4D11v2-OKT3 para unirse específicamente a CD3ε humanos en experimentos de unión a ELISA.

40 La Figura 14 es una serie de fotografías que representan el análisis PAGE de digestos uPA que demuestran la activación de anticuerpos activables multiespecíficos sin escisión de fusiones scFv de cadena pesada.

La Figura 15 es una serie de gráficos que representan la capacidad de los anticuerpos activables multiespecíficos activados para unirse a varias dianas.

45 La Figura 16A es un gráfico que representa la unión de anticuerpos multiespecíficos de la descripción a células T Jurkat CD3ε-positivas.

La Figura 16B es una gráfica que representa la unión de anticuerpos multiespecíficos de la descripción a células T Jurkat CD3ε-positivas y EGFR.

50 La Figura 17 es una serie de gráficos que representan la activación dependiente de EGFR de células T Jurkat por anticuerpos multiespecíficos de la descripción.

La Figura 18A es un gráfico que representa la activación dependiente de EGFR de células T CD8⁺ primarias mediante anticuerpos multiespecíficos de la descripción.

55 La Figura 18B es un gráfico que representa la destrucción dependiente de EGFR de células diana mediante anticuerpos multiespecíficos de la descripción.

60 La Figura 18C es una serie de gráficos que representan la activación de CD69 de células T primarias por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N en células SW480 que expresan EGFR en comparación con la activación mínima en células U266 EGFR-negativas.

65 La Figura 18D es una serie de gráficos que representan la destrucción dependiente de EGFR de células diana por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N en células SW480 que expresan EGFR en comparación con la destrucción insignificante en las células U266 EGFR-negativas.

La Figura 19 es una serie de gráficas que representan la lisis de células T primarias de un panel de líneas celulares que expresan EGFR mediante el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N en comparación con la ausencia de lisis de la línea celular U266 EGFR-negativa.

5 La Figura 20A y la Figura 20B son una serie de gráficos que representan la disminución de la unión del anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N a células que expresan EGFR en comparación con la unión de EGFR por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N. Además, las Figuras 20A y 20B demuestran que la activación de proteasa del anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N por matriptasa (también denominado en esta invención MTSP1 o MT-SP1) restaura la unión de EGFR a un nivel equivalente al exhibido por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N. Las Figuras 20A y 20B también demuestran que dicho anticuerpo activable multiespecífico y anticuerpo multiespecífico se unen a EGFR de una manera similar a la del anticuerpo activable monoespecífico y el anticuerpo monoespecífico respectivos.

15 La Figura 21A y la Figura 21B son una serie de gráficos que representan la unión del anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, anticuerpo activado activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, y anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N a células T Jurkat CD3ε-positivas.

20 La Figura 22 es una gráfica que representa la disminución de la activación dependiente de EGFR de células T Jurkat por el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N en comparación con la activación por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N. Además, la figura demuestra que la activación de proteasa del anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N por matriptasa restaura la activación dependiente de EGFR a un nivel equivalente al exhibido por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N.

25 La Figura 23A es una gráfica que representa la disminución de la activación dependiente de EGFR de células T CD8+ primarias por el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N en comparación con la activación por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N. Además, la figura demuestra que la activación de proteasa del anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N por matriptasa restaura la activación dependiente de EGFR a un nivel equivalente al exhibido por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N.

30 La Figura 23B es un gráfico que representa la disminución de la destrucción dependiente de EGFR de células diana por el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N en comparación con la destrucción por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N. Además, la figura demuestra que la activación de proteasa del anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N por la matriptasa restaura la destrucción de células diana dependientes de EGFR a un nivel equivalente al exhibido por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 La presente descripción proporciona anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos. Tal como se usa en esta invención, un anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo que reconoce dos o más antígenos o epítopos diferentes, y un anticuerpo activable multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico que incluye al menos un resto de enmascaramiento (MM) unido a al menos un dominio de unión a antígeno o epítipo del anticuerpo multiespecífico de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del dominio de unión a antígeno o epítipo para unirse a su diana. Los anticuerpos multiespecíficos activables proporcionados en esta invención son estables en circulación, se activan en los sitios previstos de terapia y/o diagnóstico, pero no en tejido normal, es decir, tejido sano, y, cuando se activan, exhiben unión a una diana que es al menos comparable al anticuerpo correspondiente multiespecífico no modificado.

50 Ejemplos no taxativos de anticuerpos multiespecíficos incluyen anticuerpos biespecíficos, anticuerpos trispecíficos, anticuerpos tetraespecíficos y otros anticuerpos multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos proporcionados en esta invención también son multivalentes; tal como se usa en esta invención, multivalencia se refiere a la cantidad total de sitios de unión en el anticuerpo, independientemente de si los sitios de unión reconocen los mismos antígenos o epítopos o diferentes. Ejemplos no limitantes de anticuerpos activables multiespecíficos incluyen anticuerpos activable biespecíficos, anticuerpos activable trispecíficos, anticuerpos activable tetraespecíficos y otros anticuerpos activables multiespecíficos. Los anticuerpos activables multiespecíficos proporcionados en esta invención también son multivalentes.

60 En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de los mismos y/o anticuerpos activables multiespecíficos o fragmentos de los mismos se diseñan para acoplarse a células T y/u otras células efectoras inmunitarias. Los anticuerpos activables multiespecíficos o fragmentos de los mismos de acoplamiento de células T también se denominan en esta invención anticuerpos multiespecíficos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos y/o anticuerpos activables multiespecíficos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos activables multiespecíficos o fragmentos de los mismos que se acoplan a células efectoras inmunitarias también se mencionan en esta invención como anticuerpos multiespecíficos que se acoplan a células efectoras inmunitarias o fragmentos de los mismos y/o anticuerpos activables multiespecíficos que se acoplan a células efectoras inmunitarias o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos o

fragmentos de los mismos y/o anticuerpos activables multiespecíficos o fragmentos de los mismos se diseñan para unirse o interactuar de otro modo con más de una diana y/o más de un epítipo, también denominados en esta invención anticuerpos dirigidos a multi-antígenos o fragmentos de los mismos y/o anticuerpos activables dirigidos a multi-antígenos o fragmentos de los mismos.

En algunas realizaciones, un anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo incluye un dominio IgG y un dominio scFv. En algunas realizaciones, un anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo incluye un dominio variable IgG y un dominio scFv. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo tiene especificidad por un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por un antígeno de superficie de células T. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo tiene especificidad por un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por otro antígeno diana. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo tiene especificidad por un epítipo de un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por otro epítipo del mismo antígeno diana.

Diversas realizaciones de anticuerpos activables multiespecíficos o fragmentos de los mismos de la descripción son mostradas en las Figuras 3A y 5-9. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo que comprende una IgG tiene los dominios variables de IgG enmascarados. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo que comprende un scFv tiene los dominios scFv enmascarados. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo tiene tanto dominios variables de IgG como dominios scFv, donde al menos uno de los dominios variables de IgG está acoplado a un resto de enmascaramiento. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo tiene tanto dominios variables de IgG como dominios de scFv, donde al menos uno de los dominios de scFv está acoplado a un resto de enmascaramiento. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo tiene tanto dominios variables de IgG como dominios de scFv, donde al menos uno de los dominios variables de IgG está acoplado a un resto de enmascaramiento y al menos uno de los dominios de scFv está acoplado a un resto de enmascaramiento. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo tiene tanto dominios variables de IgG como dominios de scFv, donde cada uno de los dominios variables de IgG y los dominios de scFv está acoplado a su propio resto de enmascaramiento. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo tiene especificidad por un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por un antígeno de superficie de células T. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo tiene especificidad por un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por otro antígeno diana. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo tiene especificidad por un epítipo de un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por otro epítipo del antígeno diana.

En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de los mismos de la descripción incluyen al menos (i) un anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo que incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento de células T que es un antígeno de superficie en una célula T y (ii) un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son el mismo antígeno. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son antígenos diferentes. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son epítopos diferentes en el mismo antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo está unido al extremo N de la cadena pesada del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células T o fragmento del mismo se une al extremo C de la cadena pesada del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células T o fragmento del mismo se une al extremo N de la cadena ligera del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo se une al extremo C de la cadena ligera del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico comprende anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos unidos a una combinación de uno o más extremos N y/o uno o más extremos C del anticuerpo multiespecífico. La descripción también incluye anticuerpos multiespecíficos que comprenden otro anticuerpo de acoplamiento de células efectoras inmunitarias o fragmento del mismo, tal como uno que se une a un antígeno de superficie de una célula citolítica natural (NK), una célula mononuclear, tal como una célula mononuclear mieloide, un macrófago y/u otras células efectoras inmunitarias.

En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo de la descripción incluye al menos dos anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos que se acoplan a uno o más receptores de activación de células T, tales como, por ejemplo, Fragmentos de scFv de acoplamiento de células T, que incluyen, pero sin limitarse a, OX40/GITR, CD 137/ GITR, CD 137/OX40, CD27/NKG2D. y una combinación adicional de receptores de activación, y un anticuerpo de unión a diana tal que los fragmentos de scFv de acoplamiento de células T se unen a ambos brazos del anticuerpo de unión a la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo de la descripción incluye dos anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos que se acoplan a uno o más receptores inhibidores de células T, y un anticuerpo de unión a diana tal que los fragmentos scFv de acoplamiento de células T están unidos a ambos brazos del anticuerpo de unión a la diana. En

algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a la misma diana de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a diferentes dianas de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a epítomos diferentes en la misma diana de acoplamiento de células T.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo de la descripción incluye al menos (i) un primer brazo que comprende un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de acoplamiento de células T que incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento de células T y (ii) un segundo brazo que comprende un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de unión al antígeno del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo incluye (iii) al menos un tercer fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de unión a la diana que incluye un tercer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB3) que se une a una tercera diana. En algunas realizaciones, la segunda y tercera o más dianas son el mismo antígeno. En algunas realizaciones, la segunda y tercera o más dianas son antígenos diferentes. En algunas realizaciones, la segunda y tercera diana o más dianas son epítomos diferentes en el mismo antígeno.

20 En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos o fragmentos de los mismos de la descripción incluyen al menos (i) un anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo que incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento de células T que es un antígeno de superficie en una célula T, donde el AB1 se une a un resto de enmascaramiento (MM) de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del AB1 de unirse a la primera diana y (ii) un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son el mismo antígeno. 25 En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son antígenos diferentes. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son epítomos diferentes en el mismo antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células T o fragmento del mismo se une al extremo N de la cadena pesada del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células T o fragmento del mismo se une al extremo C de la cadena pesada del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento a células T o fragmento del mismo se une al extremo N de la cadena ligera del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo se une al extremo C de la cadena ligera del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico comprende anticuerpos de acoplamiento a células T o fragmentos de los mismos unidos a una combinación de uno o más extremos N y/o uno o más extremos C del anticuerpo activable multiespecífico. La descripción también incluye anticuerpos activables multiespecíficos que comprenden otro anticuerpo de acoplamiento de células efectoras inmunitarias o fragmento del mismo, tal como uno que se une a un antígeno de superficie de una célula citolítica natural (NK), una célula mononuclear, tal como una célula mononuclear mieloide, un macrófago y/u otras células efectoras inmunitarias.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo de la divulgación incluye al menos (i) dos anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de anticuerpo de los mismos que se acoplan a uno o más receptores de activación de células T, tal como, por ejemplo, fragmentos scFv de acoplamiento de células T, que incluyen, de modo no taxativo, OX40/ GITR, CD137/ GITR, CD 137/OX40, CD27/NKG2D, y una combinación adicional de receptores de activación, donde el ABI de uno de los fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se une a un resto de enmascaramiento (MM) de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad de ese AB1 de unirse a su respectiva diana de acoplamiento de células T, y (ii) un anticuerpo de unión a diana tal que los fragmentos scFv de acoplamiento de células T se unen a ambos brazos del anticuerpo de unión a la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo de la descripción incluye dos anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos que se acoplan a uno o más receptores inhibidores de células T y un anticuerpo de unión a diana de modo que los fragmentos scFv de acoplamiento de células T están unidos a ambos brazos del anticuerpo de unión a la diana. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a la misma diana de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a diferentes dianas de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se acoplan a diferentes epítomos en la misma diana de acoplamiento de células T.

60 En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo de la descripción incluye al menos (i) dos anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de anticuerpos de los mismos que se acoplan a uno o más receptores de activación de células T, tales como, por ejemplo, fragmentos de scFv de acoplamiento de células T, que incluyen pero sin limitarse a, OX40/GITR, CD 137/ GITR, CD 137/OX40, CD27/NKG2D, y combinación adicional de receptores de activación, donde cada uno de AB1 de los fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se une a su propio resto de enmascaramiento (MM) de modo que el acoplamiento de cada MM a su AB1 respectivo reduce la capacidad de ese AB1 de unirse a su diana de acoplamiento de células T respectiva, y (ii) un anticuerpo de unión a diana tal que los fragmentos scFv de acoplamiento de células T se unen a ambos brazos del anticuerpo de unión a la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo de la descripción incluye dos anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos que se acoplan a uno

o más receptores inhibidores de células T y un anticuerpo de unión a diana de modo que los fragmentos scFv de acoplamiento de células T estén unidos a ambos brazos del anticuerpo de unión a la diana. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a la misma diana de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a diferentes

- 5 dianas de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a epítomos diferentes en la misma diana de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos se acoplan a uno o más receptores inhibidores de células T en lugar de uno o más receptores activadores de células T.
- 10 En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo de la descripción incluye al menos (i) un primer brazo que comprende un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de acoplamiento de células T que incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento a células T, donde el AB1 se une a un resto de enmascaramiento (MM) de modo que el
- 15 un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de unión al antígeno que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son el mismo antígeno. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son antígenos diferentes. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son epítomos diferentes en el mismo antígeno. En algunas realizaciones, los anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos se acoplan a uno o
- 20 más receptores inhibidores de células T en lugar de uno o más receptores activadores de células T.

En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos o fragmentos de los mismos de la descripción incluyen al menos (i) un anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo que incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento de

25 células T que es un antígeno de superficie en un célula T y (ii) un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 se une a un resto de enmascaramiento (MM) de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del AB2 de unirse a la segunda diana. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son el mismo antígeno. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son antígenos diferentes. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son epítomos diferentes en el mismo antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo se une al extremo N de la cadena pesada del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo se une al

30 extremo C de la cadena pesada del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo se une al extremo N de la cadena ligera del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo se une al extremo C de la cadena ligera del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico comprende anticuerpos de acoplamiento a células T o fragmentos de los mismos unidos a una combinación de uno o más extremos N y/o uno o más extremos C del anticuerpo activable multiespecífico. La descripción también incluye anticuerpos activables multiespecíficos que comprenden otro anticuerpo de acoplamiento

35 de células efectoras inmunitarias o fragmento del mismo, tal como uno que se une a un antígeno de superficie de una célula citolítica natural (NK), un célula mononuclear, tal como una célula mononuclear mieloide, un macrófago y/u otras células efectoras inmunitarias.

40

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo de la divulgación incluye al menos (i) dos anticuerpos que se acoplan a células T o fragmentos de anticuerpos de los mismos que se acoplan a uno o más receptores de activación de células T, tales como, por ejemplo, fragmentos de scFv de acoplamiento de células T, que incluyen, pero sin limitarse a, OX40/GITR, CD137/ GITR., CD137/OX40, CD27/NK02D, y una combinación adicional de receptores de activación y (ii) un anticuerpo de unión a diana que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 se une a un resto de enmascaramiento (MM) de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del AB2 de unirse a la segunda diana, donde los fragmentos scFv de acoplamiento de células T se unen a ambos brazos del anticuerpo de unión a la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo de la presente descripción incluye dos anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos que se acoplan a uno o más receptores inhibidores de células T y un anticuerpo de unión a diana de modo que los fragmentos scFv de

50 acoplamiento de células T se unen a ambos brazos del anticuerpo de unión a la diana. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a la misma diana de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a diferentes dianas de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a epítomos diferentes en la misma diana de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos se acoplan a uno o más receptores inhibidores de células T en lugar de a uno o más receptores activadores de células T.

55

60

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo de la descripción incluye al menos (i) un primer brazo que comprende un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de acoplamiento de células T y (ii) un segundo brazo que comprende un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de unión a la diana que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda

65

diana, donde el AB2 se une a un resto de enmascaramiento (MM) de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son el mismo antígeno. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son antígenos diferentes. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son epítomos diferentes en el mismo antígeno. En algunas realizaciones, los anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos se acoplan a uno o más receptores inhibidores de células T en lugar de uno o más receptores de activación de células T.

En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos o fragmentos de los mismos incluyen al menos (i) un anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo que incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento a células T, que es un antígeno de superficie en una célula T, donde el AB1 está unido a un resto de enmascaramiento (MM1) de tal forma que el acoplamiento del MM1 reduce la capacidad del AB1 para unirse a la primera diana, y (ii) un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de tal forma que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 para unirse a la segunda diana. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son el mismo antígeno. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son antígenos diferentes. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son epítomos diferentes en el mismo antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo se une al extremo N de la cadena pesada del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo se une al extremo C de la cadena pesada del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo se une al extremo N de la cadena ligera del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento del mismo se une al extremo C de la cadena ligera del anticuerpo específico de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico comprende anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos unidos a una combinación de uno o más extremos N y/o uno o más extremos C del anticuerpo activable multiespecífico. La descripción también incluye anticuerpos activables multiespecíficos que comprende otro anticuerpo de acoplamiento de células efectoras inmunitarias o fragmento del mismo, tal como uno que se une a un antígeno de superficie de una célula citolítica natural (NK), un célula mononuclear, tal como una célula mononuclear mielóide, un macrófago y/u otras células efectoras inmunitarias.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo de la divulgación incluye al menos (i) dos anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de anticuerpo del mismo que se acoplan a uno o más receptores que activan células T, tales como, por ejemplo, fragmentos scFv de acoplamiento de células T, que incluyen pero sin limitarse a, OX40/GITR, CD137/GITR, CD137/OX40, CD27/ NKG2D, y combinación adicional de receptores de activación, donde el AB1 de uno de los fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se une a un resto de enmascaramiento (MM) de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad de ese AB1 de unirse a su respectiva diana de acoplamiento de células T, y (ii) un anticuerpo de unión a diana que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 se une a un resto de enmascaramiento (MM2) de modo que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 de unirse a la segunda diana, donde los fragmentos scFv de acoplamiento de células T se unen a ambos brazos del anticuerpo de unión a la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo de la descripción incluye dos anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos que se acoplan a uno o más receptores inhibidores de células T y un anticuerpo de unión a diana de modo que los fragmentos scFv de acoplamiento de células T se unan a ambos brazos del anticuerpo de unión a la diana. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a la misma diana de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a diferentes dianas de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a epítomos diferentes en la misma diana de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos se acoplan a uno o más receptores inhibidores de células T en lugar de uno o más receptores de activación de células T.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo de la descripción incluye al menos (i) dos anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de anticuerpo de los mismos que se acoplan a uno o más receptores de activación de células T, tal como, por ejemplo, fragmentos scFv de acoplamiento de células T, que incluyen pero sin limitarse a, OX40/GITR, CD137/ GITR, CD137/OX40, CD27/NKG2D, y combinación adicional de receptores de activación, donde cada uno de AB1 de los fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T está unido a su propio resto de enmascaramiento (MM1) de modo que el acoplamiento de cada MM1 a su respectivo AB1 reduce la capacidad de ese AB1 de unirse a su respectiva diana de acoplamiento de células T, y (ii) un anticuerpo de unión a diana que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 está unido a un resto de enmascaramiento (MM2) de modo que el acoplamiento del MM2 reduce la capacidad del AB2 de unirse a la segunda diana, donde los fragmentos scFv de acoplamiento de células T están unidos a ambos brazos del anticuerpo de unión de la diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico o fragmento del mismo de la descripción incluye dos anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos que se acoplan a uno o más receptores inhibidores de células T y un anticuerpo de unión a diana de modo que los fragmentos scFv de acoplamiento de células T se unen a ambos brazos del anticuerpo de unión a la diana. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a

la misma diana de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a diferentes dianas de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo de acoplamiento de células T se unen a diferentes epítomos en la misma diana de acoplamiento de células T. En algunas realizaciones, los anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos se acoplan a uno o más receptores inhibidores de células T en lugar de uno o más receptores activadores de células T.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico o fragmento del mismo de la descripción incluye al menos (i) un primer brazo que comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acoplamiento de células T que incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento de células T, donde el AS1 se une a un resto de enmascaramiento (MM1) de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del AB1 de unirse a la primera diana y (ii) un segundo brazo que comprende un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de acoplamiento de células T que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 se une a un resto de enmascaramiento (MM2) de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del AB2 de unirse a la segunda diana. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son el mismo antígeno. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son antígenos diferentes. En algunas realizaciones, la primera y segunda dianas son epítomos diferentes en el mismo antígeno. En algunas realizaciones, los anticuerpos de acoplamiento de células T o fragmentos de los mismos se acoplan a uno o más receptores inhibidores de células T en lugar de uno o más receptores activadores de células T.

En algunas realizaciones, el antígeno diana es un antígeno que está altamente expresado tanto en tejido normal y sano como en tejido enfermo. En algunas realizaciones, el antígeno diana es un antígeno de la Tabla 1 que se expresa altamente tanto en tejido normal y sano como en tejido enfermo.

En algunas realizaciones, el antígeno diana es un antígeno que se expresa altamente en el tejido enfermo, pero no se expresa fuertemente en el tejido normal y sano. En algunas realizaciones, el antígeno diana es un antígeno de la Tabla 1 que está altamente expresado en tejido enfermo, pero no está altamente expresado en tejido normal y sano. El antígeno diana puede ser expresado en tejido sano normal, pero no se expresa altamente ni se sobre-expresa de otra manera en el tejido sano normal.

En algunas realizaciones, el resto de enmascaramiento (MM) está acoplado al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB) a través de un resto escindible (CM) que funciona como un sustrato para una proteasa. Proteasas adecuadas para su uso en los anticuerpos activable multiespecíficos de la descripción se determinan en función de la expresión de proteasa en el sitio previsto de tratamiento y/o diagnóstico. En algunas realizaciones, la proteasa es un activador de plasminógeno de tipo u (uPA, también denominado uroquinasa), legumaina y/o matriptasa (también denominado MT-SP1 o MTSP1). En algunas realizaciones, la proteasa es una metaloproteasa de matriz (MMP).

En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos se modifican genéticamente para incluir un resto de enmascaramiento (MM) que está acoplado a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB) a través de un enlazador no escindible. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico es un anticuerpo activable multiespecífico de acoplamiento de células T que incluye un anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo de acoplamiento a células T o porción de unión a antígeno del mismo, donde el anticuerpo de acoplamiento a células T o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento a células T, donde el AB1 se une a través de un enlazador no escindible a un resto de enmascaramiento (MM1) de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del AB1 de unirse a la primera diana, y el anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo no se enmascara.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico es un anticuerpo activable multiespecífico de acoplamiento de células T que incluye un anticuerpo dirigido o fragmento de unión al antígeno del mismo y un anticuerpo de acoplamiento de células T o porción de unión al antígeno del mismo, donde el anticuerpo de acoplamiento de células T o fragmento de unión al antígeno del mismo incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de acoplamiento de células T, donde el AB1 se une a través de un enlazador no escindible a un resto de enmascaramiento (MM1) de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del AB1 de unirse a la primera diana, y el anticuerpo dirigido o fragmento de unión al antígeno del mismo incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana, donde el AB2 se une a través de un enlazador escindible a un resto de enmascaramiento (MM2) de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del AB2 de unirse a la segunda diana.

El concepto general de anticuerpos biespecíficos se introdujo por primera vez hace al menos 50 años (Nisonoff, A. y Mandy, W.J., Nature 194, 355-359 (1962), como se cita en Chan, A.C. y Carter, P.J. Nature Reviews Immunol. 10, 301-316 (2010)).

Se ha descrito una variedad de plataformas biespecíficas (véase, por ejemplo, Figura 1; Liu, M.A. y col., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 82, 8648-8652 <1985); revisado por Krocsen. B.J. col. Adv. Drug Delivery Rev. 31, 105-129 (1998); Marvin. J.S. y Zhu, Z., Acta Pharm. Sinica 26, 649-658 (2005); Chan y Carter, Nat. Rev. Immunol. 2010; Fitzgerald y Lugovsky, MAbs. 3(3):299-309 (2011); Rielhmuller, G., Cancer Immunity 12, 12-18 (2012)). El concepto general, para la construcción de anticuerpos biespecíficos es unir dominios de unión a prolina, generalmente basados en múltiples dominios de inmunoglobulina, con el fin de construir una molécula que sea capaz de unirse a dos o más antígenos diana y demuestre distribución fisiológica, farmacocinética y función efectora similar a IgG. Estos últimos pueden incluir citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Reclutamiento de células T (BiTEs™) (Véase, *por ejemplo*, Baeuerle. P.A. y Reinhardt, C., Cancer Res. 69, 4941-4944 (2009). y TandAbs™ (véase Cochiovius y col., Cancer Res. 54, 4336-4341 (2000)), y/o la administración de una carga útil citotóxica en forma de un resto conjugado químicamente tal como un inhibidor de microtúbulos, un alquilador de ADN u otra toxina, en forma de un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). Se están estudiando muchos formatos de anticuerpos biespecíficos, con IgG y BiTEs™ heterodiméricos convencionales que representan los más avanzados clínicamente a pesar de su producción y propiedades farmacológicas subóptimas (véase Chan y Carter. Nat. Rev. Immunol. 2010). Los anticuerpos biespecíficos tienen muchos usos potenciales, basados en características específicas de formatos particulares y los antígenos diana elegidos; no todos los formatos biespecíficos son apropiados para todas las aplicaciones. Por ejemplo, el format Dos-en-uno Fab (Bostrom, J., y col., Science 323, 1610-1614 (2009)) consiste en un único dominio de unión para unirse a los antígenos A y B de una manera u otra; por lo tanto, este tipo de biespecífico puede acoplarse a dos copias del antígeno A, dos copias del antígeno B o una copia de cada antígeno. Por otro lado, el formato DVD (Wu, C., Y col., Nature Biotechnol. 25, 1290-1297 (2007)) proporciona el acoplamiento de dos copias del antígeno A además de dos copias del antígeno B. La separación y la orientación relativa de cada uno de los dominios de unión también pueden ser importantes para el acoplamiento de múltiples antígenos de tal manera que confieran la actividad prevista, por ejemplo, receptores de reticulación (Jackman, J., y col., J. Biol. Chem. 285. 20850-20859 (2010)), donde se requiere el acoplamiento de una copia de cada receptor, puede requerir una interacción monovalente con cada uno de dos antígenos distintos.

Un área mecánicamente distinta de la aplicación de anticuerpo biespecífico implica reclutar células efectoras inmunitarias (tales como células T citotóxicas, células NK y/o células efectoras mieloides) para atacar células tumorales mediante la construcción de un biespecífico que se acopla tanto a un antígeno en la superficie de una célula dirigida a la citotoxicidad (p. ej., una célula tumoral) como a un antígeno en la superficie de una célula inmunitaria citotóxica (p. ej., una célula T). Catumaxomab es un ejemplo de un anticuerpo biespecífico clínicamente validado que se dirige al antígeno tumoral EpCAM en células cancerosas y recluta células T citotóxicas mediante la unión a CD3 en la superficie de células T (Linke, R., Klein, A., y Seimetz, D., mAbs 2, 129-136 (2010)); sin embargo, su uso ha sido limitado y requiere administración intraperitoneal. Los anticuerpos BiTE™ son anticuerpos biespecíficos que logran el reclutamiento de células T en un formato diferente con diferentes propiedades farmacológicas (Baeuerle, P. A. y Reinhardt, C. Anti-Cancer Res. 69, 4941 - 4944 (2009))-en particular, los anticuerpos BiTE se componen de dos fragmentos variables de cadena simple (scFv) y tienen vidas medias farmacológicas muy cortas *IN VIVO*, por lo tanto, requieren la administración a través de infusión continua. Un formato similar, denominado TandAb™, es una construcción de diacuerpo biespecífico tetravalente en la que dos dominios variables se unen a un antígeno diana y dos dominios variables se unen a CD3 en la superficie de las células T (Cochlovius y col., Cancer Res. 60, 4336-4341 (2000)). Este formato ilustra que el acoplamiento bivalente tanto del antígeno diana como del antígeno de superficie de células T se puede utilizar para el acoplamiento de células T y la citotoxicidad dirigida al antígeno. Sin embargo, el formato TandAb también tiene una vida media muy corta *in vivo*.

Una limitación general de los anticuerpos biespecíficos de acoplamiento de células T se relaciona con el hecho de que la citotoxicidad de las células T puede ser extremadamente potente y se puede activar mediante niveles relativamente bajos de antígeno diana en la superficie de las células. Por lo tanto, incluso niveles modestos de expresión del antígeno diana, como EGFR en tejidos sanos pueden conducir a una toxicidad significativa, limitando o impidiendo las aplicaciones terapéuticas clínicas (Lutterbuese, R. y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 12605-12610(2010)). Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de terapias efectivas a base de anticuerpos que exhiban una seguridad mejorada, por ejemplo, una toxicidad reducida.

Los anticuerpos activables multiespecíficos de la descripción son más seguros que los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) porque la actividad de los anticuerpos activables multiespecíficos está restringida a un entorno de enfermedad localizado. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico es un anticuerpo activable multiespecífico de acoplamiento de células efectoras inmunitarias. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico es un anticuerpo activable multiespecífico que se acopla a células T. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico reconoce dos o más dianas. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico comprende un formato IgG-scFv que confiere las propiedades de semivida larga de una IgG. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo activable multiespecífico se modula adicionalmente a través del uso de mutaciones Fc en el sitio de unión a FcRn (Petkova, S. B. y col., Intl. Immunol. 18, 1759-1769 (2006); Deng, R. y col., mAbs 4, 101-109 (2012); Olafson, T Methods Mol. Biol. 907, 537-556 (2012)). En algunas realizaciones, dicho anticuerpo activable multiespecífico incluye mutaciones en el dominio Fc, tal como una mutación N297A (Lund, J. y col., Mol. Immunol. 29, 53-39 (1992)) que reduce las funciones efectoras de IgG (ADCC y CDC) para reducir las toxicidades fuera de la diana.

Los anticuerpos activables multiespecíficos aprovechan la regulación por aumento de la actividad de la proteasa

ampliamente reconocida como un sello distintivo de múltiples estados de enfermedad para lograr un direccionamiento específico tejido-enfermedad de tales terapias. El anticuerpo activable se basa en el uso de un anticuerpo IgG, o fragmento del mismo, tal como una región scFv, región Fab, dominio VH o VL simple que se ha modificado para incluir un resto de enmascaramiento (MM), unido al anticuerpo a través de un resto escindible (CM), tal como un resto escindible de proteasa (véase, por ejemplo, Publicación Internacional PCT Número WO 2009/025846, publicada el 26 de febrero de 2009; Publicación Internacional PCT Número WO 2010/081173, publicado el 15 de julio de 2010). Alternativamente, un dominio de proteína sin anticuerpo (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT Número WO 2010/096838, publicada el 26 de agosto de 2010; Boersma, Y.L. y col., J. Biol. Chem. 286, 41273-41285 (2011)) se puede utilizar para lograr una o más especificidades de unión. Un anticuerpo multiespecífico, como IgG convencional, se puede utilizar como el punto de partida para producir un anticuerpo activable multiespecífico. Dicho anticuerpo activable multiespecífico permitiría el direccionamiento de alta afinidad de todos los antígenos reconocidos por el anticuerpo multiespecífico original, pero con especificidad tisular dictada por el enlazador escindible activado selectivamente. Dependiendo del formato multiespecífico utilizado, el MM y CM pueden colocarse en el extremo N o C del dominio apropiado.

Un anticuerpo activable multiespecífico comprende al menos un dominio derivado de IgG con especificidad hacia un primer antígeno, unido sintética o biosintéticamente a otro dominio (que puede derivar de una IgG u otra proteína) con especificidad para unirse a un segundo antígeno. Se pueden añadir especificidades adicionales mediante la unión de dicho anticuerpo activable multiespecífico a uno o más dominios adicionales que confieren especificidades de unión adicionales para el primer antígeno, el segundo antígeno o antígenos adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico tiene uno o más de estos dominios enmascarados por un resto de enmascaramiento (MM) adecuado. Cada uno de los formatos multiespecíficos descritos en la Figura 1 se puede convertir potencialmente en un anticuerpo activable multiespecífico al enmascarar uno o más de los restos de unión al antígeno de uno o más de los dominios de inmunoglobulina. Ejemplos de formatos de anticuerpos activables multiespecíficos adecuados se muestran en las Figuras 3 A y 5-9.

El uso de un dominio scFv para conferir especificidad a un antígeno específico permite una construcción modular de anticuerpos multiespecíficos y anticuerpos activables multiespecíficos. El uso de los dominios scFv fusionados al extremo de las cadenas pesadas o ligeras de IgG para la construcción de anticuerpos biespecíficos se ha descrito anteriormente (véase, por ejemplo, Orcutt, K.D. y col., Prot. Eng. Design Select. 23, 221-228 (2010); Dong y col., (2011)). Este formato ("IgG-scFv") permite que una IgG convencional se convierta en un anticuerpo biespecífico donde una primera especificidad se codifica en los dominios variables de la IgG y una segunda especificidad se codifica en los dominios scFv unidos a través de una región enlazadora flexible. Variaciones de este formato incluyen la fusión de dominios scFv en los extremos N o C de las cadenas pesadas o ligeras; los scFv pueden tener las mismas o diferentes especificidades de unión al antígeno (Spangler, J. B. y col., J. Mol. Biol. 422, 532-544 (2012)). Además, mediante el uso de heterodímeros de cadena pesada (por ejemplo, usando la construcción botón-orificio o construcciones similares), los scFv de diferentes especificidades se pueden unir al extremo N o C de cada cadena pesada.

En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico que comprende una IgG tiene los dominios variables de IgG enmascarados. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico tiene los dominios scFv enmascarados. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico tiene tanto los dominios variables de IgG como los dominios scFv enmascarados. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo activable multiespecífico tiene especificidad por un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por un antígeno de superficie de células T. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo activable multiespecífico tiene especificidad por un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por otro antígeno diana. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo activable multiespecífico tiene especificidad por un epítipo de un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por otro epítipo del antígeno diana.

La descripción proporciona ejemplos de estructuras de anticuerpos activables multiespecíficos que incluyen, pero sin limitarse a, los siguientes: (VL-CL)₂(VH-CH1-CH2-CH3-LA-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂; (VL-CL)₂(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*)₂; (VL-CL)₂(MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL)₂(MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂(VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂(VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VL-CL)₂(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂(MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂(MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)₂(MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)₂(MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; o (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂(VH*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂. donde: VL y VH representan los dominios variables

ligeros y pesados de la primera especificidad, contenidos en la IgG; VL* y VH* representan los dominios variables de la segunda especificidad, contenidos en el scFv; L1 es un péptido enlazador que conecta el resto de enmascaramiento (MM) y el resto escindible (CM); L2 es un péptido enlazador que conecta el resto escindible (CM) y el anticuerpo; L3 es un péptido enlazador que conecta los dominios variables del seFv; L4 es un péptido enlazador que conecta el anticuerpo de la primera especificidad con el anticuerpo de la segunda especificidad; CL es el dominio constante de cadena ligera; y CH1, CH2, CH3 son los dominios constantes de cadena pesada. Las primera y segunda especificidades pueden ser hacia cualquier antígeno o epítipo. Estructuras específicas incluyen, entre otras, las siguientes: (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂:(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂:(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂:(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)₂:(VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂:(VH-CH1-CH2-CH3)₂; o (MM-L1-CM-L2-VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)₂:(VH-CH1-CH2-CH3)₂.

En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico que comprende una IgG tiene los dominios variables de IgG enmascarados. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico que comprende un scFv tiene los dominios de scFv enmascarados. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico tiene tanto dominios variables de IgG como dominios de scFv, donde al menos uno de los dominios variables de IgG está acoplado a un resto de enmascaramiento. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico tiene tanto dominios variables de IgG como dominios de scFv, donde al menos uno de los dominios de scFv está acoplado a un resto de enmascaramiento. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico tiene tanto dominios variables de IgG como dominios de scFv, donde al menos uno de los dominios variables de IgG está acoplado a un resto de enmascaramiento y al menos uno de los dominios de scFv está acoplado a un resto de enmascaramiento. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico tiene tanto dominios variables de IgG como dominios de scFv, donde cada uno de los dominios variables de IgG y los dominios de scFv está acoplado a su propio resto de enmascaramiento. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo activable multiespecífico tiene especificidad por un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por un antígeno de superficie de células T. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo activable multiespecífico tiene especificidad por un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por otro antígeno diana. En algunas realizaciones, un dominio de anticuerpo de un anticuerpo activable multiespecífico tiene especificidad por un epítipo de un antígeno diana, y otro dominio de anticuerpo tiene especificidad por otro epítipo del antígeno diana.

En algunas realizaciones de un anticuerpo activable multiespecífico de acoplamiento de células efectoras inmunitarias, tal como un anticuerpo activable multiespecífico de acoplamiento de células T, un antígeno es típicamente un antígeno presente en la superficie de una célula tumoral u otro tipo de célula asociado con la enfermedad, tal como, pero sin limitarse a, cualquier diana enumerada en la Tabla 1, tal como, pero sin limitarse a, EGFR, erbB2, EpCAM, Jagged, PD-L1, B7H3 o CD71 (receptor de transferrina), y otro antígeno es típicamente un antígeno estimulante o inhibidor presente en la superficie de una célula T, célula citolítica natural (NK), célula mononuclear mieloide, macrófago y/u otra célula efectora inmunitaria, tal como, pero sin limitarse a, B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 o VISTA. El dominio del anticuerpo que confiere especificidad al antígeno de superficie de las células T también puede estar sustituido por un ligando o dominio de ligando que se une a un receptor de células T, un receptor de células NK, un receptor de macrófagos y/u otro receptor de células efectoras inmunes, tal como, sin limitarse a, B7-1, B7-2, B7H3, PD-L1, PD-L2 o TNFSF9. En algunas realizaciones de un anticuerpo activable dirigido a múltiples antígenos, un antígeno se selecciona de entre el grupo de dianas enumeradas en la Tabla 1, y otro antígeno se selecciona de entre el grupo de dianas enumeradas en la Tabla 1.

En algunas realizaciones, un dominio variable de cadena simple, específico para unirse a una diana que se muestra en la superficie de células T, se fusiona al extremo carboxilo de un anticuerpo IgG1 completamente humano (anticuerpo dirigido) que se une a un antígeno de superficie celular. La fusión del scFv puede ser al extremo carboxilo de la cadena pesada, al extremo carboxilo de la cadena ligera o a ambas cadenas (Figura 2). En algunas realizaciones, un dominio variable de cadena simple, específico para unirse a una diana que se muestra en la superficie de células T, se fusiona con el extremo amino de un anticuerpo IgG1 completamente humano (anticuerpo dirigido) que se une a un antígeno de superficie celular. La fusión del scFv puede ser al extremo amino de la cadena pesada, al extremo amino de la cadena ligera o a ambas cadenas. Las fusiones se construyen como una sola construcción genética y se expresa en células en cultivo. El anticuerpo dirigido puede ser específico para la unión a uno o más antígenos de superficie tumoral, o cualquier célula dirigida a depleción. El scFv puede ser específico para el mismo o diferentes antígenos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es un anticuerpo anti-EGFR. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es C225v5, que es específico para la unión a EGFR. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es C225, que es específico para la unión a EGFR. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es C225v4, que es específico para la unión a EGFR. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es C225v6, que es específico para la unión a EGFR. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es un anticuerpo anti-Jagged. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es 4D11, que es específico para la unión a Jagged 1 y Jagged 2 humano y de ratón. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido es 4D11v2, que es específico para la unión a Jagged 1 y Jagged 2 humano y de ratón.

En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido puede estar en forma de un anticuerpo activable. En algunas realizaciones, los scFv pueden tener la forma de Pro-scFv (véase, p. ej., WO 2009/025846. WO 2010/081173).

- 5 En algunas realizaciones, el scFv es específico para unirse a CD3ε; por ejemplo, OKT3. En algunas realizaciones, el scFv es específico para la unión a CTLA-4 (también denominado en esta invención CTLA y CTLA4).

- 10 En algunas realizaciones, el scFv es específico para la unión de una o más células T, una o más células NK y/o uno o más macrófagos. En algunas realizaciones, el scFv es específico para unirse a una diana seleccionada de entre el grupo que consiste en B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, C1725, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIM3 o VISTA, y combinaciones de los mismos.

Definiciones

- 15 A menos que se defina de otro modo en esta invención, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular y química e hibridación de proteínas y oligonucleótidos o polinucleótidos descritas en esta invención son
20 aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para la síntesis de oligonucleótidos de ADN recombinante y el cultivo y transformación de tejidos (*por ejemplo*, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en esta invención. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente según procedimientos convencionales bien conocidos en la
25 técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, p. ej., Sambrook y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en esta invención son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Técnicas
30 estándar se utilizan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

Según se utiliza según la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, tienen los siguientes significados:

- 35 Como se emplea en esta invención, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno. Por "se une específicamente" o "inmunorreacciona con" o "se une inmunoespecíficamente" se entiende que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos
40 del antígeno deseado y no reacciona con otros polipéptidos o se une con una afinidad mucho menor ($K_d > 10^{-6}$). Los anticuerpos incluyen, pero sin limitarse a, fragmentos policlonales, monoclonales, quiméricos, anticuerpo de dominio, monocatenarios, Fab y F(ab')₂, scFv, y una biblioteca de expresión de Fab.

- Se sabe que el conjunto estructural básico de un anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción de extremo amino de cada cadena incluye una
45 región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción de extremo carboxi de cada cadena define una región constante que es la principal responsable de la función efectora. En general, las moléculas de anticuerpo obtenidas de humanos se relacionan con cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases también tienen subclases, tales como IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ y otras. Además, en los
50 seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

- El término "anticuerpo monoclonal" (mAb) o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en esta invención, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un único producto génico de cadena ligera y un único producto génico de cadena pesada. En particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los mAb contienen un sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única por él.
55

- El término "sitio de unión a antígeno" o "porción de unión" se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión a antígeno. El sitio de unión a antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables ("V") del extremo N de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera, denominadas "regiones hipervariables", se interponen entre tramos
60 flanqueantes más conservados conocidos como "regiones marco" o "FR". Por consiguiente, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran en la naturaleza entre, y adyacentes a, regiones hipervariables en

inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas relativas entre sí en un espacio tridimensional para formar una superficie de unión a antígeno. La superficie de unión a antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se denominan "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de las Secuencias de Kabat de proteínas de interés inmunológico (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987). Chothia y col. Nature 342:878- 883 (1989).

Como se usa en esta invención, el término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina, un scFv o un receptor de células T. El término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden generarse contra péptidos de extremo N o extremo C de un polipéptido. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$; por ejemplo, en algunas realizaciones, $\leq 100 \text{ nM}$ y en algunas realizaciones, $\leq 10 \text{ nM}$.

Como se usa en esta invención, los términos "unión específica", "unión inmunológica" y "propiedades de unión inmunológica" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunológica se puede expresar en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, donde una K_d menor representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológica de los polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar mediante el uso de procedimientos conocidos en la técnica. Uno de estos procedimientos implica medir las tasas de formación y disociación de complejos de sitio/antígeno de unión a antígeno, donde esas tasas dependen de las concentraciones de las parejas de complejos, la afinidad de la interacción, y los parámetros geométricos que influyen igualmente en la tasa en ambas direcciones. Por lo tanto, tanto la "constante en la tasa" (K_{on}) como la "constante fuera de la tasa" (K_{off}) pueden determinarse por el cálculo de las concentraciones y las tasas reales de asociación y disociación. (Véase Nature 361:186-87 (1993)). La relación de K_{off}/K_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación K_d . (Véase, generalmente, Davies y col.(1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Se dice que un anticuerpo de la presente descripción se une específicamente a EGFR, cuando la constante de unión de equilibrio (K_d) es $\leq 1 \mu\text{M}$, por ejemplo en algunas realizaciones $\leq 100 \text{ nM}$, en algunas realizaciones $\leq 10 \text{ nM}$, y en algunas realizaciones $\leq 100 \text{ pM}$ a aproximadamente 1 pM , conforme medido por ensayos tales como ensayos de unión a radioligando o ensayos similares conocidos por los expertos en la técnica.

El término "polinucleótido aislado", como se usa en esta invención, significará un polinucleótido de origen genómico, ADNc, o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está unido operativamente a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no se encuentra en la naturaleza como parte de una secuencia más grande. Los polinucleótidos según la descripción incluyen las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada mostradas en esta invención, y las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera mostradas en esta invención.

El término "proteína aislada" a la que se hace referencia en esta invención significa una proteína de ADNc, ARN recombinante u origen sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, o fuente de obtención, la "proteína aislada" (1) no está asociada con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas murinas, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no se encuentra en la naturaleza.

El término "polipéptido" se usa en esta invención como un término genérico para referirse a proteínas nativas, fragmentos o análogos de una secuencia de polipéptidos. Por lo tanto, los fragmentos de proteínas nativas y los análogos son especies del género polipéptido. Los polipéptidos según la descripción comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada mostradas en esta invención, y las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera mostradas en esta invención, así como las moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tal como las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa, y viceversa, así como fragmentos y análogos de las mismas.

El término "de origen natural", como se usa en esta invención, como se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluidos los virus) que puede ser aislada de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio o de otra manera es de origen natural.

El término "unido operativamente", como se usa en esta invención, se refiere a las posiciones de los componentes así

descritos que están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de control "unida operativamente" a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control.

- 5 La expresión "secuencia de control", como se usa en esta invención, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para llevar a cabo la expresión y procesamiento de secuencias codificantes a las cuales están unidas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen promotor, sitio de unión a ribosomas, y secuencia de terminación de la transcripción en eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de pareja de fusión. El término "polinucleótido" al que se hace referencia en esta invención significa nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN monocadena y bicadena.

El término oligonucleótido al que se hace referencia en esta invención incluye nucleótidos de origen natural y modificados unidos entre sí por enlaces oligonucleotídicos de origen natural y no naturales. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que generalmente comprende una longitud de 200 bases o menos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen de 10 a 60 bases de longitud, por ejemplo en algunas realizaciones, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos suelen ser monocadena, *p. ej.*, para sondas, aunque los oligonucleótidos pueden ser de cadena doble, *por ejemplo*, para su uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos de la descripción son oligonucleótidos de sentido o antisentido.

- 25 El término "nucleótidos de origen natural" al que se hace referencia en esta invención incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" al que se hace referencia en esta invención incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces oligonucleotídicos" al que se hace referencia en esta invención incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoseleniato, fosforodiseleniato, fosforoanilato, fosforanilato, fosforonmidato, y similares. Véase *p.ej.*, LaPlanche y *col.*, Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec y *col.*, J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein y *col.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon y *col.* Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon y *col.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991); Stec y *col.* Patente EE. UU. No. 5.151.510: Uhlmann and Peynman Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir un marcador para la detección, si se desea.

35 Como se usa en esta invención, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Ver Immunology - A Synthesis (2ª Edición, E.S. Golub y D.R. Gren. Eds., Sinauer Associates. Sunderland7 Mass. (1991)). Estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales, tales como aminoácidos α , α -disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente descripción. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4 hidroxiprolina, γ -carboxiglutámico, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-actilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos utilizada en esta invención, la dirección de la izquierda es la dirección del extremo amino y la dirección de la derecha es la dirección del extremo carboxi, según el uso y la convención estándar.

Del mismo modo, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de secuencias de polinucleótidos de cadena simple es el extremo 5', la dirección izquierda de las secuencias de polinucleótidos de doble cadena se denomina como la dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se denomina regiones de secuencia de dirección de transcripción en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que se encuentran 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias corriente arriba", regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en el extremo 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias corriente abajo".

- 55 Según se aplica a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están alineadas de manera óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT que usan pesos de espacio predeterminados, comparten al menos el 80 por ciento de identidad de secuencia. En algunas realizaciones, al menos el 90 por ciento de identidad de secuencia. En algunas realizaciones, al menos el 95 por ciento de identidad de secuencia, y en algunas realizaciones, al menos el 99 por ciento de identidad de secuencia.

60 En algunas realizaciones, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos.

65 Como se analiza en esta invención, variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos o las moléculas de inmunoglobulina se contemplan incluidas por la presente descripción, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos se mantengan al menos al 75 %, por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos al 80 %,

90 %, 95 %, y en algunas realizaciones, al 99 %. En particular, se contemplan reemplazos conservadores de aminoácidos. Sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en cuanto a sus cadenas laterales. Aminoácidos codificados genéticamente generalmente se dividen en familias: (1) aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) aminoácidos no polares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, y (4) aminoácidos polares no cargados son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos hidrófilos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina. Los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que son la familia hidroxialifática; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano y tirosina, que son la familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente no tendrá un efecto importante sobre la unión o propiedades de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no implica un aminoácido dentro de un sitio marco. Se puede determinar fácilmente si un cambio de aminoácido da como resultado un péptido funcional ensayando la actividad específica del derivado de polipéptido. Los ensayos se describen en detalle en esta invención. Fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina se pueden preparar fácilmente por medio de expertos en la materia. En algunas realizaciones, los extremos amino y carboxi de fragmentos o análogos ocurren cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse mediante la comparación de los datos de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos con las bases de datos de secuencias públicas o privadas. Se usan procedimientos de comparación computarizados para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de proteínas pronosticados que tienen lugar en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen procedimientos para identificar secuencias proteicas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie y col. Science 253:164 (1991). Por lo tanto, los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales según la descripción.

En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alteran las afinidades de unión, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos. Los análogos pueden incluir varias mutaciones de una secuencia distinta de la secuencia peptídica de origen natural. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras) pueden hacerse en la secuencia natural (por ejemplo, en la porción del polipéptido fuera del dominio o dominios que forman contactos intermoleculares). Una sustitución conservadora de aminoácidos no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debería tender a romper una hélice que se produce en la secuencia original, ni alterar otros tipos de la estructura secundaria que caracteriza la secuencia original). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Brandon y J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Theron y col. Nature 354:105 (1991).

El término "fragmento de polipéptido", como se usa en esta invención, se refiere a un polipéptido que tiene una delección en el extremo amino y/o en el extremo carboxi y/o una o más delecciones internas, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural deducida, por ejemplo, de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los fragmentos típicamente tienen al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud, por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos 14 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, al menos 20 aminoácidos de longitud, usualmente al menos 50 aminoácidos de longitud, y en algunas realizaciones, al menos 70 aminoácidos de longitud. El término "análogo", como se usa en esta invención, se refiere a polipéptidos que están comprendidos por un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene una identidad sustancial con una porción de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene una unión específica a la diana EGFR, en condiciones de unión adecuadas. Típicamente, los análogos de polipéptidos comprenden una sustitución conservadora de aminoácidos (o adición o eliminación) con respecto a la secuencia de origen natural. Los análogos típicamente tienen al menos 20 aminoácidos de longitud, por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos 50 aminoácidos de longitud o más, y a menudo pueden ser tan largos como un polipéptido de origen natural de longitud completa.

El término "agente" se usa en esta invención para representar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos.

Como se usa en esta invención, los términos "marcador" o "marcado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de restos de biotín que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse por procedimientos ópticos o calorimétricos). En ciertas situaciones, la etiqueta o marcador también puede ser terapéutica. Se conocen en la técnica y se pueden usar diversos procedimientos para marcar polipéptidos y glucoproteínas. Ejemplos de marcadores para polipéptidos

incluyen, pero sin limitarse a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (*por ejemplo*, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{130}I), etiquetas fluorescentes (por ejemplo, una rodamina fluorófora, fósforos de lantánido), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (*por ejemplo*, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metales, etiquetas de epítopos). En algunas realizaciones, los marcadores están unidos por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. El término "agente farmacéutico o fármaco", como se usa en esta invención, se refiere a un compuesto o composición química capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente.

Como se usa en esta invención, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y en algunas realizaciones, una fracción sustancialmente purificada es una composición donde la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en base molar) de todas las especies macromoleculares presentes.

Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, en algunas realizaciones, más de aproximadamente el 85 %, 90 %, 95 % y el 99 %. En algunas realizaciones, la especie objeto se purifica a una homogeneidad esencial (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición mediante procedimientos de detección convencionales), donde la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

El término paciente incluye sujetos humanos y veterinarios.

Otros términos químicos en esta invención se utilizan según el uso convencional en la técnica, como lo ejemplifica The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms ("Parker. S.. Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Anticuerpos Multiespecíficos y Anticuerpos Activables Multiespecíficos

Ejemplos de anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos de la descripción incluyen, por ejemplo, los que se muestran en los Ejemplos proporcionados en esta invención y variantes de los mismos.

En algunas realizaciones no taxativas, al menos uno de los AB en el anticuerpo multiespecífico es una pareja de unión para cualquier diana enumerada en la Tabla 1.

Tabla 1 Dianas ejemplares

I-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LAG-3	STEAP1
Alfa-4 integrin	CD56	DLK1	Hialuronidasa	LIF-R	STEAP2
Alfa-V integrin	CD64	DLL4	ICOS	Lewis X	TAG-72
I-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LAG-3	STEAP1
alfa4beta1integrin	CD70	DPP-4	IFNalfa	LIGHT	TAPA1
alfa4beta7 integrin	CD71	DSG1	IFNbeta	LRP4	TGFbeta
AGR2	CD74	EGFR	IFNgamma	LRRC26	TIGIT
Anti-Lewis-Y		EGFRviii	IgE	MCSP	TIM-3
Apelin J receptor	CD80	Endothelin B	IgE Receptor	Mesothelin	TLR2
		receptor (ETBR) (FceRI)			
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MRP4	TLR4
B7-H4	CD86	EpCAM	IGFIR	MUCI	TLR6
BAFF	CD95	EPHA2	IL1.B	Mucin-16 (MUC16, CA-125)	TLR7

ES 2 912 932 T3

BTLA	CD117	EPHB2	ILIR	Na/K ATPase	TLR8
C5 complemento	CD125	ERBB3	IL2	Neutrofil elastasa	TLR9
C-242	CD132	F proteína	IL11	NGF	TMEM31
	IL-2RG)	de RSV			
CA9	CD133	FAP	IL12	Nicastrin	TNFalfa
CA19-9 (Lewis a)	CD137	FGF-2	IL12p40	Notch Receptors	TNFR
Carbonic	CD138	FGF8	IL-12R, IL-	Notch 1	TNFRS12 A
anhydrase 9			12Rbeta1		
CD2	CD166	FGFR1	IL13	Notch 2	TRAIL-R1
CD3	CD172A	FGFR2	IL13R	Notch 3	TRAIL-R2
CD6	CD248	FGFR3	IL 15	Notch 4	Transferrina
CD9	CDH6	FGFR4	IL17	NOV	Receptor de transferrina
CD 11a	CEACAM5 (CEA)	Receptor de folato	IL 18	OSM-R	TRK-A
CD 19	CEACAM6 (NCA-90)	GAL3ST1	IL21	OX-40	TRK-B
CD20	CLAUDIN-3	G-CSF	IL23	PAR2	uPAR
CD22	CLAUDIN-4	G-CSFR	IL23R	PDGF-AA	VAP1
CD24	cMet	GD2	IL27/IL27R (WSX1)	PDGF-BB	VCAM-1
CD25	Colágeno	GITR	IL29	PDGFRalfa	VEGF
CD27	Cripto	GLUT1	IL-31R	PDGFRbcta	VEGF-A
CD28	CSFR	GLUT4	IL31/IL31R	PD-1	VEGF-B
CD30	CSFR-1	GM-CSF	IL2R	PD-L1	VEGF-C
CD33	CTLA-4	GM-CSFR	IL4	PD-L2	VEGF-D
CD38	CTGF	Receptores GP IIb/IIIa	IL4R	Fosfatidilserina	VEGFR1
CD40	CXCL10	G130	IL6, IL.6R	P1GF	V.EGFR2
CD40L	CXCL13	GPIIB/IIIA	Insulina Receptor	PSCA	VEGFR3
I-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LAG-3	STEAP1
CD41	CXCR1	GPMB	Jagged Ligandos	PSMA	VISTA
CD44	CXCR2	GRP78	Jagged 1	RAAG12	WISP-1
CD44v6	CXCR4	HER2/neu	Jagged 2	RAGE	WISP-2
CD47		HGF		SLC44A4	WISP-3
CD51	CYR61	hGH		Esfingosina 1 Fosfato	

En algunas realizaciones no taxativas, al menos uno de los AB del anticuerpo multiespecífico es o se deriva de una secuencia expuesta en la Tabla 7 en los Ejemplos proporcionados en esta invención.

En algunas realizaciones no taxativas, al menos uno de los AB del anticuerpo multiespecífico es un derivado de un anticuerpo enumerado en la Tabla 2.

Tabla 2: Fuentes ejemplares para AB

Nombre comercial del Anticuerpo (nombre del anticuerpo)	Diana ^a
Avastin TM (bevacizumab)	VEGF
Lucentis TM (ranibizumab)	VEGF
Eibitux TM (cetuximab)	EGFR
Vecitibix TM (panitumumab)	EGFR
Remicade TM (infliximab)	TNf α
Humira TM (adalimumab)	TNF α
Tysabri TM (natalizumab)	Integrin α 4
Simulect TM (basiliximab)	IL2R
Soliris TM (eculizumab)	Complement C5
Raptiva TM (efalizumab)	CD11a
Bexxar TM (tositumomab)	CD20
Zevalin TM (ibritumomab tiuxetan)	CD20
Rituxan TM (rituximab)	CD20
Ocrelizumab	CD20
Arzerra TM (ofatumumab)	CD20
Obinutuzumab	CD20
Zenapax TM (daclizumab)	CD25
Adcentris TM (brentuximab vedotin)	CD30
Mylotarg TM (gemtuzumab)	CD33
Mylotarg TM (gemtuzumab ozogamicin)	CD33
Campath TM (alemtuzumab)	CD52
ReoPro TM (abciximab)	Glycoprotein receptor IIb/IIIa
Xolair TM (omalizumab)	IgE
Herceptin TM (trastuzumab)	Her2
Kadcyla TM (trastuzumab emtansine)	Her2

Nombre comercial del Anticuerpo (nombre del anticuerpo)	Diana ^a
Synagis [™] (palivizumab)	F protein of RSV
(ipilimumab)	CTLA-4
(tremelimumab)	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(pertuzumab)	Her2-neu
(ertumaxomab)	CD3/Her2-neu
Orencia [™] (abatacept)	CTLA-4
(tanezumab)	NGF
(bavituximab)	Phosphatidylserine
(zalutumumab)	EGFR
(mapatumumab)	EGFR
(matuzumab)	EGFR
(nimotuzumab)	EGFR
ICR62	EGFR
mAb 528	EGFR
CH806	EGFR
MDX-447	EGFR/CD64
(edrecolomab)	EpCAM
RAV12	RAAG12
huJ591	PSMA
Enbrel [™] (etanercept)	TNF-R
Amevive [™] (alefacept)	1-92-LFA-3
Antril [™] , Kineret [™] (anakinra)	IL-1Ra
GC1008	TGFbeta
	Notch, p.e., Notch 1
	Jagged 1 o Jagged 2
(adecatumumab)	EpCAM
(figitumumab)	IGF1R
(tocilizumab)	IL-6 receptor
Stelara [™] (ustekinumab)	IL-12/IL-23
Prolia [™] (denosumab)	RANKL

También se incluyen en la descripción los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos descritos en esta invención.

Los expertos en la materia reconocerán que es posible determinar, sin experimentación indebida, si un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico tiene la misma especificidad o una especificidad similar que un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción al determinar si el primero evita que el último se una a una diana. Si el anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico que

se evalúa compete con el anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción, como se muestra por una disminución en la unión por el anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción, a continuación los dos anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos se unen al mismo epítipo o a un epítipo estrechamente relacionado.

Una realización para determinar si un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico tiene la misma especificidad o una especificidad similar que un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción es preincubar el anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción con diana soluble con la que normalmente reacciona, y luego agregar el anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico que se está analizando para determinar si el anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico que se está analizando está inhibido en su capacidad de unirse a la diana. Si el anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico que se evalúa se inhibe a continuación, con toda probabilidad, tiene la misma especificidad epítópica, o funcionalmente equivalente, que el anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción.

Se genera un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos en los Ejemplos proporcionados a continuación. Un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico también se puede generar usando cualquiera de una serie de técnicas reconocidas en la técnica para la producción y/o purificación de anticuerpos.

Fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, F(ab')₂ y Fab, para su uso en un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico se pueden preparar mediante escisión de la proteína intacta, por ejemplo, mediante proteasa o escisión química. Alternativamente, se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción del fragmento F(ab')₂ incluiría secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguidas de un codón de terminación de traducción para proporcionar la molécula truncada.

Vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, YAC, Cpisomas derivados de EBV y similares. Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción adecuados modificados genéticamente para que cualquier secuencia VH o VL se pueda insertar y expresar fácilmente. En dichos vectores, el empalme generalmente ocurre entre el sitio donante de empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de empalme que precede a la región C humana, y también en las regiones de empalme que ocurren dentro de los exones CH humanos. La poliadenilación y la terminación de la transcripción ocurren en sitios cromosómicos nativos corriente abajo de las regiones codificantes. El anticuerpo resultante puede unirse a cualquier promotor fuerte, que incluye LTR retrovirales, *por ejemplo*, promotor temprano de SV-40, (Okayama y col. Mol. Cell. Bio. 3:280 (1983)). Rous sarcoma virus LTR (Gorman y col. P.N.A.S. 79:6777 (1982)) y LTR del virus de la leucemia murina de moloncia (Grosschedl y col. Cell 41:885 (1985)). Además, como se apreciará, se pueden usar promotores de Ig nativos y similares.

Además, los anticuerpos multiespecíficos y los anticuerpos activables multiespecíficos pueden generarse a través de tecnologías de tipo de visualización, que incluyen, de modo no taxativo, visualización en fagos, visualización retroviral, visualización ribosómica y otras técnicas, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica y las moléculas resultantes se pueden someter a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que dichas técnicas son bien conocidas en la técnica. Wright y col. Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992), Hanes y Plucklun PNAS USA 94:4937-4942 (1997) (visualización ribosómica), Parroly y Smith Gene 73:305-318 (1988) (visualización en fagos), Scott, TIBS, vol. 17:241-245 (1992), Cwirla y col. PNAS USA 87:6378-6382 (1990), Russel y col. Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993), Hoganboom y col. Immunol. Reviews 130:43-68 (1992), Chiswell y McCafferty TIBTECH; 10:80-8A (1992). y Patente EE. UU. No. 5.733.743.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo multiespecífico y el anticuerpo activable multiespecífico de la descripción con respecto a la función efectora, para mejorar o reducir dicha función para mejorar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de enfermedades y trastornos. Por ejemplo, se pueden introducir residuos de cisteína en la región Fc, lo que permite la formación de enlaces de disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor destrucción celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). (Véase Caron y col, J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes. J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)).

De manera alternativa, se puede modificar genéticamente un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y, por lo tanto, puede tener capacidades mejoradas de lisis de complemento y ADCC. (Véase Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989)). En algunas realizaciones, las mutaciones de Fc se realizan para eliminar sitios de glicosilación, reduciendo así la función de Fc.

Anticuerpos Activables Multiespecíficos

Los anticuerpos activables multiespecíficos y las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos proporcionadas en esta invención contienen al menos un primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo (al que se hace referencia colectivamente como AB1 a lo largo de la descripción) que se une específicamente a una

primera diana y/o un primer epítipo y un segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo (al que se hace referencia colectivamente como AB2 a lo largo de la descripción) que se une específicamente a una segunda diana y/o un segundo epítipo, donde al menos uno del AB se modifica mediante un resto de enmascaramiento (MM). En algunas realizaciones, cada AB en un anticuerpo activable multiespecífico es modificado por su propio resto de enmascaramiento.

Cuando el menos uno de los AB en un anticuerpo activable multiespecífico se modifica con un MM y está en presencia de su diana, la unión específica del AB a su diana se reduce o se inhibe, en comparación con la unión específica del AB no modificado con un MM o la unión específica del AB original a la diana.

El K_d del AB modificado con un MM hacia la diana es al menos 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o más, o entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-1.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1.000 - 1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 veces mayor que el K_d del AB no modificado con un MM o del AB original hacia la diana. Por el contrario, la afinidad de unión del AB modificado con un MM hacia la diana es de al menos 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o más, o entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1.000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 de veces menor que la afinidad de unión del AB no modificado con un MM o del AB original hacia la diana.

La constante de disociación (K_d) del MM hacia al menos uno del AB en el anticuerpo activable multiespecífico es generalmente mayor que la K_d del AB hacia la diana. La K_d del MM hacia el AB puede ser de al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 o incluso 10.000.000 veces mayor que la K_d del AB hacia la diana. Por el contrario, la afinidad de unión del MM hacia el AB es generalmente menor que la afinidad de unión del AB hacia la diana. La afinidad de unión de MM hacia el AB puede ser de al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 o incluso 10.000.000 veces menor que la afinidad de unión del AB hacia la diana.

Cuando al menos uno de los AB en el anticuerpo activable multiespecífico se modifica con un MM y está en presencia de la diana, la unión específica del AB a su diana se reduce o se inhibe, en comparación con la unión específica del AB no modificado con un MM o la unión específica del AB original a la diana. En comparación con la unión del AB no modificado con un MM o la unión del AB original a la diana, la capacidad del AB para unirse a la diana cuando se modifica con un MM se puede reducir en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % e incluso 100 % durante al menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, o 96 horas, o 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 180 días, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses o más cuando se mide *in vivo* o en un ensayo *in vitro*.

El MM inhibe la unión de al menos uno de los AB en el anticuerpo activable multiespecífico a su diana. El MM se une al dominio de unión a antígeno del AB e inhibe la unión del AB a su diana. El MM puede inhibir estéricamente la unión del AB a la diana. El MM puede inhibir alostéricamente la unión del AB a su diana. En estas realizaciones, cuando el AB se modifica o acopla a un MM y en presencia de la diana, no hay unión o sustancialmente ninguna unión del AB a la diana, o no más de 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o 50 % de unión del AB a la diana, en comparación con la unión del AB no modificado con un MM, el AB original, o el AB no acoplado a un MM a la diana, durante al menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, o 96 horas, o 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 180 días, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses o más cuando se mide *in vivo* o en un ensayo *in vitro*.

Cuando al menos uno de los AB en un anticuerpo activable multiespecífico está acoplado o modificado por un MM, el MM "enmascara" o reduce o inhibe de otro modo la unión específica del AB a la diana. Cuando al menos uno de los AB en un anticuerpo activable multiespecífico está acoplado o modificado por un MM, dicho acoplamiento o modificación puede efectuar un cambio estructural que reduce o inhibe la capacidad del AB para unirse específicamente a su diana.

En un anticuerpo activable multiespecífico, cuando al menos un AB está acoplado o modificado con un MM, al menos una porción del anticuerpo activable multiespecífico puede estar representada por las siguientes fórmulas (en orden desde una región de extremo amino (N) a una región de extremo carboxilo (C)):

(MM)-(AB)
(AB)-(MM)
(MM)-L-(AB)
(AB)-L-(MM)

donde MM es un resto de enmascaramiento, el AB es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, y el L es

un enlazador. En muchas realizaciones, puede ser deseable insertar uno o más enlazadores, por ejemplo, enlazadores flexibles, en la composición para proporcionar flexibilidad.

- 5 En ciertas realizaciones, el MM no es una pareja de unión natural del AB. En algunas realizaciones, el MM no contiene o sustancialmente no tiene homología con ninguna pareja de unión natural del AB. En otras realizaciones, el MM es no más de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % similar a cualquier pareja de unión natural del AB. En algunas realizaciones, el MM es no más de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % idéntico a cualquier pareja de unión natural del AB. En algunas realizaciones, el MM no es más de un 25 % idéntico a cualquier pareja de unión natural del AB.
- 10 En algunas realizaciones, el MM no es más de un 50 % idéntico a cualquier pareja de unión natural del AB. En algunas realizaciones, el MM es no más de un 20 % idéntico a cualquier pareja de unión natural del AB. En algunas realizaciones, el MM no es más de un 10 % idéntico a cualquier pareja de unión natural del AB.

- 15 En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos incluyen un AB que está modificado por un MM y también incluye uno o más restos escindibles (CM). Dichos anticuerpos activables multiespecíficos exhiben unión activable/conmutable, a la diana del AB. Anticuerpos activables multiespecíficos generalmente incluyen al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB), modificado por o acoplado a un resto de enmascaramiento (MM) y un resto modificable o escindible (CM). En algunas realizaciones, el CM contiene una secuencia de aminoácidos que sirve como sustrato para una proteasa de interés.

- 20 Los elementos de los anticuerpos activables multiespecíficos están dispuestos de manera que el MM y el CM se posicionan de tal forma que, en un estado escindido (o relativamente activo) y en presencia de una diana, el AB correspondiente se une a una diana, mientras que, en un estado no escindible (o relativamente inactivo) en presencia de la diana, la unión específica del AB a su diana se reduce o se inhibe. La unión específica del AB a su diana puede reducirse debido a la inhibición o el enmascaramiento de la capacidad del AB para unirse específicamente su diana por el MM.

- 25 El K_d de cada AB modificado con un MM y un CM hacia la diana, es al menos 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o más, o entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1.000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 veces mayor que el K_d del AB no modificado con un MM y un CM o del AB original hacia la diana. Por el contrario, la afinidad de unión de cada AB modificado con un MM y un CM hacia la diana, es de al menos 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o mayor, o entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1.000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 de veces menor que la afinidad de unión del AB no modificado con un MM y un CM o del AB original hacia la diana.

- 40 Cuando el AB se modifica con un MM y un CM y está en presencia de la diana pero no en presencia de un agente modificador (por ejemplo, una proteasa), la unión específica del AB a su diana se reduce o se inhibe, en comparación con la unión específica del AB no modificado con un MM y un CM o del AB original a la diana. Cuando se compara con la unión del AB original o la unión de un AB no modificado con un MM y un CM a su diana, la capacidad del AB para unirse a la diana cuando se modifica con un MM y un CM se puede reducir en al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % e incluso 100 % por al menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, o 96 horas o 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 180 días, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses o más cuando se mide *in vivo* o en un ensayo *in vitro*,

- 50 Como se usa en esta invención, el término estado escindido se refiere a la condición de los anticuerpos activables multiespecíficos luego de la modificación del CM por una proteasa. El término estado no escindido, como se usa en esta invención, se refiere a la condición de los anticuerpos activables multiespecíficos en ausencia de escisión del CM por una proteasa. Como se ha analizado anteriormente, el término "anticuerpos activables" se usa en esta invención para referirse a un anticuerpo activable tanto en su estado no escindido (nativo) como en su estado escindido. Será evidente para el experto en la técnica que, en algunas realizaciones, un anticuerpo activable escindido puede carecer de un MM debido a la escisión del CM por una proteasa, dando como resultado la liberación de al menos el MM (por ejemplo, cuando el MM no está unido a los anticuerpos activables multiespecíficos por un enlace covalente (*por ejemplo*, un enlace disulfuro entre residuos de cisteína).

- 60 Por activable o conmutable se entiende que el anticuerpo activable multiespecífico exhibe un primer nivel de unión a una diana cuando se encuentra en un estado inhibido, enmascarado o no escindido (*es decir*, una primera conformación), y un segundo nivel de unión a la diana, en el estado desinhibido, desenmascarado y escindido (*es decir*, una segunda conformación), donde el segundo nivel de unión a la diana es mayor que el primer nivel de unión, en general, el acceso de la diana a la AB correspondiente del anticuerpo activable multiespecífico es mayor en presencia de un agente de escisión capaz de escindir el CM que en ausencia de este, un agente de escisión. Por lo tanto, cuando el anticuerpo activable multiespecífico está en el estado no escindido, al menos un AB se inhibe la unión

a la diana y puede enmascararse de la unión a la diana (*es decir*, la primera conformación es tal que el AB no puede unirse a la diana), y en el estado escindido, el AB no se inhibe o se desenmascara con respecto a la unión a la diana.

El CM y AB de los anticuerpos activables multiespecíficos se seleccionan de modo que el primer AB represente un resto de unión para una primera diana y/o epítipo, y el CM representa un sustrato para una proteasa que es co-localizada con la diana en un sitio de tratamiento o sitio de diagnóstico en un sujeto. Los anticuerpos activables multiespecíficos descritos en esta invención encuentran un uso particular donde, por ejemplo, una proteasa capaz de escindir un sitio en el CM está presente a niveles relativamente más altos en el tejido que contiene la diana de un sitio de tratamiento o sitio de diagnóstico que en el tejido de sitios sin tratamiento (por ejemplo, en tejido sano).

En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos proporcionan una toxicidad reducida y/o efectos secundarios adversos que de otro modo podrían ser resultado de la unión del primer AB en sitios sin tratamiento si el AB no se enmascara o se inhibe de otro modo su unión a la diana.

En general, un anticuerpo activable multiespecífico puede diseñarse seleccionando un AB de interés y construyendo el resto del anticuerpo activable de manera que, cuando esté conformacionalmente limitado, el MM proporcione el enmascaramiento del AB o la reducción de la unión del AB a su diana. Se deben tener en cuenta los criterios de diseño estructural para proporcionar esta característica funcional.

Se proporcionan anticuerpos activables multiespecíficos que exhiben un fenotipo conmutable de un intervalo dinámico deseado para la unión a la diana en una conformación inhibida frente a una no inhibida. El intervalo dinámico generalmente se refiere a una relación de (a) un nivel máximo detectado de un parámetro en un primer conjunto de condiciones con respecto a (b) un valor mínimo detectado de ese parámetro en un segundo conjunto de condiciones. Por ejemplo, en el contexto de un anticuerpo activable multiespecífico, el intervalo dinámico se refiere a la relación de (a) un nivel máximo detectado de unión de la proteína diana a un anticuerpo activable multiespecífico en presencia de una proteasa capaz de escindir el CM de los anticuerpos activables a (b) un nivel mínimo detectado de la proteína diana, uniéndose a un anticuerpo activable multiespecífico en ausencia de la proteasa. El intervalo dinámico de un anticuerpo activable multiespecífico puede calcularse como la relación de la constante de disociación de equilibrio del tratamiento de un agente de escisión de anticuerpos activables multiespecíficos (*por ejemplo*, enzima) con respecto a la constante de disociación de equilibrio del tratamiento del agente de escisión de anticuerpos activables. Cuanto mayor sea el intervalo dinámico de un anticuerpo activable multiespecífico, mejor será el fenotipo conmutable del anticuerpo activable. Anticuerpos activables que tienen valores de intervalo dinámico relativamente más altos (*por ejemplo*, mayor de 1) exhiben fenotipos conmutables más deseables, de tal manera que la unión de la proteína diana por los anticuerpos activables se produce en mayor medida (por ejemplo, predominantemente) en presencia de un agente de escisión (*por ejemplo*, una enzima) capaz de escindir el CM de los anticuerpos activables que en la ausencia de un agente de escisión.

Anticuerpos activables multiespecíficos se pueden proporcionar en una diversidad de configuraciones estructurales. A continuación se proporcionan fórmulas de ejemplo para al menos una porción de un anticuerpo activable multiespecífico. Se contempla específicamente que el orden del extremo N a C del AB, MM y CM puede invertirse dentro de un anticuerpo activable. También se contempla específicamente que el CM y el MM pueden solaparse en la secuencia de aminoácidos, *por ejemplo*, de modo que el CM esté contenido dentro del MM.

[Por ejemplo, al menos una porción de los anticuerpos activables multiespecíficos se puede representar mediante la siguiente fórmula (en orden de una región de extremo amino (N) a una región de extremo carboxilo (C)):

(MM)-(CM)-(AB)
(AB)-(CM)-(MM)

donde MM es un resto de enmascaramiento, CM es un resto escindible y AB es un primer anticuerpo o fragmento del mismo. Cabe señalar que, aunque MM y CM se indican como componentes distintos en las fórmulas anteriores, en todas las realizaciones ejemplares (incluidas las fórmulas) descritas en esta invención se contempla que las secuencias de aminoácidos del MM y el CM podrían superponerse, por ejemplo, de modo que el CM se contiene total o parcialmente dentro del MM. Además, las fórmulas anteriores proporcionan secuencias de aminoácidos adicionales que se pueden colocar en el extremo N o en el extremo C con respecto a los elementos de anticuerpos activables.

En determinadas realizaciones, el MM no es una pareja de unión natural del AB. En algunas realizaciones, el MM no contiene ninguna homología o sustancialmente ninguna a cualquier pareja de unión natural del AB. En otras realizaciones el MM es no más del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % similar a cualquier pareja de unión natural del AB. En algunas realizaciones, el MM no es más de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % idéntico a cualquier pareja de unión natural del AB. En algunas realizaciones, el MM es no más de 50 % idéntico a cualquier pareja de unión natural del AB. En algunas realizaciones, el MM es no más de 25 % idéntico a cualquier pareja de unión natural del AB. En algunas realizaciones, el MM no es más de 20 % idéntico a cualquier pareja de unión natural del AB. En algunas realizaciones, el MM no es más de un 10 % idéntico a cualquier pareja de unión natural del AB.

En muchas realizaciones puede ser deseable insertar uno o más enlazadores, por ejemplo, enlazadores flexibles, en la construcción de anticuerpo activable para proporcionar flexibilidad en una o más de las uniones MM-CM, la unión CM-AB, o ambas. Por ejemplo, el AB, MM y/o CM puede no contener una cantidad suficiente de residuos (por ejemplo, Gly, Ser, Asp, Asn, especialmente Gly y Ser, particularmente Gly) para proporcionar la flexibilidad deseada. Como tal, el fenotipo conmutable de dichas construcciones de anticuerpos activables multiespecíficos puede beneficiarse de la introducción de uno o más aminoácidos para proporcionar un enlazador flexible, además, como se describe a continuación, donde el anticuerpo activable multiespecífico se proporciona como una construcción restringida conformacionalmente, un enlazador flexible puede ser insertado de forma operativa para facilitar la formación y el mantenimiento de una estructura cíclica en el anticuerpo activable multiespecífico no escindido.

Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico comprende una de las siguientes fórmulas (donde la fórmula a continuación representa una secuencia de aminoácidos en dirección del extremo N- a C o en dirección del extremo C- a N):

(MM)-L1-(CM)-(AB)
(MM)-(CM)-L2-(AB)
(MM)-L1-(CM)-L2-(AB)

donde MM, CM y AB son como se definió anteriormente; en donde L1 y L2 están cada uno independientemente y opcionalmente presentes o ausentes, son los mismos o diferentes enlazadores flexibles que incluyen al menos 1 aminoácido flexible (*por ejemplo*, Gly). Además, las fórmulas anteriores proporcionan secuencias de aminoácidos adicionales que pueden posicionarse en el extremo N o C con respecto a los elementos de anticuerpos activables. Ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, restos de direccionamiento (*por ejemplo*, un ligando para un receptor de una célula presente en un tejido diana) y restos que extienden la semivida en suero (*por ejemplo*, polipéptidos que se unen a proteínas séricas, tal como inmunoglobulina (*por ejemplo*, IgG) o albúmina sérica (*por ejemplo*, albúmina sérica humana (HSA))).

En algunas realizaciones no taxativas, al menos uno de los AB en el anticuerpo activable multiespecífico es una pareja de unión para cualquier diana enumerada en la Tabla 1.

En algunas realizaciones no taxativas, al menos uno de los AB en el anticuerpo activable multiespecífico comprende, es o se deriva de una secuencia expuesta en la Tabla 7 en los Ejemplos proporcionados en esta invención.

En algunas realizaciones no taxativas, al menos uno de los AB en el anticuerpo activable multiespecífico comprende, es o se deriva de una secuencia expuesta en el Ejemplo 5 en los Ejemplos proporcionados en esta invención. En algunas realizaciones no taxativas, al menos uno de los AB en el anticuerpo activable multiespecífico comprende, es o se deriva de una secuencia expuesta en la Tabla 11 en los Ejemplos proporcionados en esta invención.

En algunas realizaciones no taxativas, al menos uno de los AB en el anticuerpo activable multiespecífico es o se deriva de un anticuerpo enumerado en la Tabla 2.

En algunas realizaciones, el resto de enmascaramiento se selecciona para su uso con un anticuerpo específico o fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, grupos de enmascaramiento adecuados para su uso con anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MM que incluyen la secuencia CISPRG (SEQ ID NO: 75). A modo de ejemplos no taxativos, el MM puede incluir una secuencia tal como CISPRGC (SEQ ID NO: 339), CISPRGCG (SEQ ID NO: 76); CISPRGCPDGPYVMY (SEQ ID NO: 77); CISPRGCPDGPYVM (SEQ ID NO: 78). CISPRGCEPGTYVPT (SEQ ID NO: 79) y CISPRGCPGQIWHPP (SEQ ID NO: 80). Otros restos de enmascaramiento adecuados incluyen cualquiera de las máscaras específicas de EGFR descritas en la publicación PCT No. WO 2010/08 1173, tal como, a modo de ejemplo no taxativo, GSHCLIPINMGAPSC (SEQ ID NO: 81); CISPRGCGSSASQSGQSGHCLIPINMGAPSC (SEQ ID NO: 82); CNHHYFYTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 83); ADHVFWSYGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 84); CHHVYWGHCISPRGCPG (SEQ ID NO: 85); CPHFTTTSCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 86); CNHHYHYCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 87); CPHVSFGSCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 88); CPYYTLSYCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 89); CNHVFYGTGCGISPRGCPG (SEQ ID NO: 90); CNHFTLTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 91); CHHFTLTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 92); YNPCATPMCCISPRGCPG (SEQ ID NO: 93); CNHHYFYTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 94); CNHHYHYCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 95); CNHVFYGTGCGISPRGCG (SEQ ID NO: 96); CHHVYWGHCISPRGCG (SEQ ID NO: 97); CPHFTTTSCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 98); CNHFTLTTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 99); CHHFTLTTCGCTSPRGCG (SEQ ID NO: 100); CPYYTLSYCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 101); CPHVSFGSCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 102); ADHVFWSYGCISPRGCG (SEQ ID NO: 103); YNPCATPMCCISPRGCG (SEQ ID NO: 104); CHHVYWGHCISPRGCG (SEQ ID NO: 105); C(N/P)H(H/V/F)(Y/ D)(F/W/T/L)(Y/G/T/SXT/S/Y/H)CGCISPRGCG (SEQ ID NO: 106); CI.SPRGCGQP.IPSVK (SEQ ID NO: 107); CISPRGCTQPYHVS(R)(SEQ ID NO: 108); y/o CISPRGCNAVSGGLS (SEQ ID NO: 109).

Restos de enmascaramiento adecuados para su uso con anticuerpos que se unen a un diana Jagged, por ejemplo, Jagged 1 y/o Jagged 2, incluyen, a modo de ejemplo no taxativo, restos de enmascaramiento que incluyen una

secuencia tal como QGQSGQCNIWLVGDCRGWQG (SEQ ID NO: 338); QGQSGQGQQWCNIWINGGDCRGWNG (SEQ ID NO: 110); PWCMQRQDFLRCPQP (SEQ ID NO: 111); QLGLPAYMCTFECLR (SEQ ID NO: 112); CNLWVSGGDCGGLQG (SEQ ID NO: 113); SCSLWTSGSCLPHSP (SEQ ID NO: 114); YCLQLPHYMQAMCGR (SEQ ID NO: 115); CFLYSCTDVSYNNT (SEQ ID NO: 116); PWCMQRQDYLRCPQP (SEQ ID NO: 117);
 5 CNLWISGGDCRGLAG (SEQ ID NO: 118); CNLWVSGGDCRGVQG (SEQ ID NO: 119); CNLW VSGGDCRGLRG (SEQ ID NO: 120); CNLWISGGDCRGLPG (SEQ ID NO: 121); CNLWVSGGDCRDAPW (SEQ ID NO: 122); CNLWVSGGDCRDLLG (SEQ ID NO: 123); CNLWVSGGDCRGLQG (SEQ ID NO: 124); CNLWLHGGDCRGWQG (SEQ ID NO: 125); CNIWLVGDCRGWQG (SEQ ID NO: 126); CTTWFCGGDCGVMRG (SEQ ID NO: 127); CNIWGPSVDCGALLG (SEQ ID NO: 128); CNIWVNGGDCRSFEG (SEQ ID NO: 129); YCLNLPRYMQDMCWA (SEQ ID NO: 130); YCLALPHYMQADCAR (SEQ ID NO: 131); CFLYSCGDVSYWWSA (SEQ ID NO: 132); CYLYSCTDSAFWNNR (SEQ ID NO: 133); CYLYSCNDVSYWSNT (SEQ ID NO: 134); CFLYSCTDVSYW (SEQ ID NO: 135); CTLYSCTDVAYWNSA (SEQ ID NO: 136); CFLYSCTD VSYWGDT (SEQ ID NO: 137); CFLYSCTDVSYWGS (SEQ ID NO: 138); CFLYSCTD VAYWNT (SEQ ID NO: 139); CFLYSCGDVSYWGNPGLS (SEQ ID NO: 140); CFLYSCTDVAYWSGT (SEQ ID NO: 141); CYLYSCTDGSYWNST (SEQ ID NO: 142); CFLYSCSDVSY WGN1 (SEQ ID NO: 143); CFLYSCTDVAYW (SEQ ID NO: 144); CFLYSCTDVSYWGST (SEQ ID NO: 145); CFLYSCTDVAYWGDT (SEQ ID NO: 146); GCNIWLNGGDCRGWVDPLQG (SEQ ID NO: 147); GCNIWLVGDCRGWIGDTNG (SEQ ID NO: 148); GCNIWLVGDCRGWIEDSNG (SEQ ID NO: 149); GCNIWANGGDCRGWIDNIDG (SEQ ID NO: 150); GCNIWLVGDCRGWLGEAVG (SEQ ID NO: 151); GCNIWLVGDCRGWLEEAVG (SEQ ID NO: 152); GGPALCNIWLNGGDCRGWSG (SEQ ID NO: 153); GAPVFCNIWLNGGDCRGWMG (SEQ ID NO: 154); GQQQWCNIWINGGDCRGWNG (SEQ ID NO: 155); GKSEFCNIWLNGGDCRGWIG (SEQ ID NO: 156); GTPGGCNIWANGGDCRGWEG (SEQ ID NO: 157); GASQYCNLWINGGDCRGWRG (SEQ ID NO: 158); GCNIWLVGDCRPWVEGG (SEQ ID NO: 159); GCNRWAVGGDCRPFVDGG (SEQ ID NO: 160); GCNIWLNGGDCRAWVDTG (SEQ ID NO: 161); GCNIWVVGDCRPFINDG (SEQ ID NO: 162); GCNIWLNGGDCRPVVFVG (SEQ ID NO: 163);
 20 GCNIWLSGGDCRMFMNEG (SEQ ID NO: 164); GCNIWVNGGDCRSFVYSG (SEQ ID NO: 165); GCNIWLNGGDCRGWEASG (SEQ ID NO: 166); GCNIWAHGGDCRGFIEPG (SEQ ID NO: 167); GCNIWLNGGDCRTFVASG (SEQ ID NO: 168); GCNIWAHGGDCRGFIEPG (SEQ ID NO: 169); GFLENCNIWLNGGDCRTG (SEQ ID NO: 170); GIYENCNIWLNGGDCRMG (SEQ ID NO: 171); y/o GIPDNCNIWINGGDCRYG (SEQ ID NO: 172).

Restos de enmascaramiento adecuados para su uso con anticuerpos que se unen a una diana de interleucina 6, por ejemplo, el receptor de interleucina 6 (IL-6R), incluyen, a modo de ejemplo no taxativo, restos de enmascaramiento que incluyen una secuencia tal como QGQSGQYGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 174); QGQSGQGDFDIPFAHWVPIT (SEQ ID NO: 175); QGQSGQMGPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 176); YRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 177); PGAFDIPFAHWYPNT (SEQ ID NO: 178); ESSCVWNYVHTYMDC (SEQ ID NO: 179); YPGCKWN YDRIFLDC (SEQ ID NO: 180); YRTCSWNYVGIFLDC (SEQ ID NO: 181); YGSCSWNY VHIFMDC (SEQ ID NO: 182); YGSCSWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 183); YGSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 184); YTSCNWNYSVHIFMDC (SEQ ID NO: 185); YPGCKWN YDRIFLDC (SEQ ID NO: 186); WRSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 187); WSNCHWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 188); DRSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 189); SGSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 190); SRSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 191); SMSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 192); YRSCNWNYSVIFLDC (SEQ ID NO: 193); YGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 194); SGSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 195); YKSCHWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 196); YGSCNWNYSVHIFMEC (SEQ ID NO: 197); FSSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 198); WRSCNWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 199); YGSCQWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 200); YRSCNWN YVHIFLDC (SEQ ID NO: 201); NMSCHWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 202); FGPCTWNYSVHIFLDC (SEQ ID NO: 203); XXsCXWXYvhlfxdC (SEQ ID NO: 204); MGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 205); RDTGGQCRWDYVHIFMDC (SEQ ID NO: 206); AGVPAGCTWNYSVHIFMEC (SEQ ID NO: 207); VGVPNGCVWNYAHIFMEC (SEQ ID NO: 208); DGGPAGCSWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 209); AVGPAGCWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 210); CTWNYSVHIFMDCGEGEGP (SEQ ID NO: 211); GGVPEGCTWNYSVHIFMEC (SEQ ID NO: 212); AEVPAGCWNY VHIFMEC (SEQ ID NO: 213); AGVPAGCTWNYSVHIFMEC (SEQ ID NO: 214); SGASGGCKWNYSVHIFMDC (SEQ ID NO: 215); MGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 216); TPGCRWNYSVHIFMECEAL (SEQ ID NO: 217); VGVPNGCVWNYAHIFMEC (SEQ ID NO: 218); POAFDJPFAHWVPNT (SEQ ID NO: 219); RGACDIPFAHWIPNT (SEQ ID NO: 220); QGDFDIPFAHWVPIT (SEQ ID NO: 221); XGafDIPFAHWvPnT (SEQ ID NO: 222); RGDGNDSDIPFAHWVPRT (SEQ ID NO: 223); SGVGRDRDIPFAHWVPRT (SEQ ID NO: 224); WAGGNDSDIPFAHWIPNT (SEQ ID NO: 225); WGDGMDVDIPFAHWVPVT (SEQ ID NO: 226); AGSGNDSDIPFAHWVPRT (SEQ ID NO: 227); ESRSGYADIPFAHWVPRT (SEQ ID NO: 228); y/o RECGRGCDIPFAHWVPRT (SEQ ID NO: 173).

En algunas realizaciones, el resto de escisión (CM) del anticuerpo activable multiespecífico incluye una secuencia de aminoácidos que puede servir como sustrato para una proteasa, generalmente una proteasa extracelular. El CM puede seleccionarse basándose en una proteasa que está co-localizada en el tejido con la diana deseada de al menos un AB del anticuerpo activable multiespecífico. Se conoce una variedad de condiciones diferentes en las que una diana de interés se localiza conjuntamente con una proteasa, donde el sustrato de la proteasa se conoce en la técnica. En el ejemplo de cáncer, el tejido diana puede ser un tejido canceroso, particularmente tejido canceroso de un tumor sólido. Hay informes en la literatura de niveles aumentados de proteasas que tienen sustratos conocidos en una cantidad de cánceres, *por ejemplo*, tumores sólidos. Véase, *por ejemplo*, La Rocca y col., (2004) British J. of Cancer

90(7): 1414-1421, Ejemplos no taxativos de enfermedad incluyen: todos los tipos de cáncer (mama, pulmón, colorrectal, próstata, melanomas, cabeza y cuello, páncreas, etc.), artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, SLE, daño cardiovascular, isquemia, etc. Por ejemplo, las indicaciones incluirían leucemias, que incluyen leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), enfermedades linfoblásticas que incluyen mieloma múltiple y tumores sólidos, que incluyen cáncer pulmonar, colorrectal, prostático, pancreático y de mama, incluyendo cáncer de mama triple negativo, . Por ejemplo, las indicaciones incluyen enfermedad ósea o metástasis en cáncer, independientemente del origen del tumor primario; cáncer de mama, que incluye a modo de ejemplo no taxativo, cáncer de mama ER/PR+, cáncer de mama Her2+, cáncer de mama triple negativo; cáncer colorrectal; cáncer endometrial; cáncer gástrico; glioblastoma; cáncer de cabeza y cuello, tal como cáncer esofágico; cáncer de pulmón, tal como a modo de ejemplo no taxativo, cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de ovario de mieloma múltiple; cáncer pancreático; cáncer de próstata; sarcoma, tal como osteosarcoma; cáncer renal, tal como a modo de ejemplo no taxativo, carcinoma de células renales; y/o cáncer de piel, tal como a modo de ejemplo no taxativo, cáncer de células escamosas, carcinoma de células basales o melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es carcinoma de células escamosas. En algunas realizaciones, el cáncer es el carcinoma de células escamosas de la piel. En algunas realizaciones, el cáncer es el carcinoma de células escamosas del esófago. En algunas realizaciones, el cáncer es carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, el cáncer es carcinoma de células escamosas delo pulmón.

El CM se escinde específicamente por una enzima a una velocidad de aproximadamente $0,001-1500 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ o al menos 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, o $1500 \times 10^{-4} \text{N}^{-1}\text{S}^{-1}$.

Para la escisión específica por una enzima, se establece el contacto entre la enzima y el CM. Cuando el anticuerpo activable multiespecífico que comprende al menos un primer AB acoplado a un MM y un CM está en presencia de una diana y actividad enzimática suficiente, el CM puede escindirse. Una actividad enzimática suficiente puede referirse a la capacidad de la enzima para entrar en contacto con el CM y realizar la escisión. Se puede prever fácilmente que una enzima puede estar en las proximidades del CM pero no puede escindirse debido a otros factores celulares o modificación de proteínas de la enzima.

Sustratos ejemplares incluyen, pero sin limitarse a, sustratos escindibles por una o más de las siguientes enzimas o proteasas enumeradas en la Tabla 3.

Tabla 3: Proteasas y/o enzimas ejemplares

ADAMS, ADAMTS. <i>p.ej.</i> ADAM8 ADAM9 ADAM10 ADAM 10 ADAM12	Proteinasas de cisteína, <i>por ejemplo</i> , Cruzipaina Legumaína Otubaina-2	Proteasas de serina, por ejemplo, proteína C activada C Cathepsina A Cathepsina G
ADAM15 ADAM 17/T ACE	KLK, por ejemplo, KLK4	Quimasa Proteasas del factor de coagulación (por ejemplo, FVI Ia, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
ADAMDEC1 ADAMTS1 ADAMTS4 ADAMTS5	KLK5 KLK6 KLK7 KLK8	Elastasa Granzima B Guanidinobenzoatasa
	KLK10	HtrA 1
Aspartato proteasas, por ejemplo, BACE Renina	KLK11 KLK13 KLK14	Elastasa de neutrófilos humanos Lactoferrina Marapsina
		NS3/4A
Catepsinas aspárticas, <i>por ejemplo</i> , Cathepsina D Cathepsina E	Metaloproteinasas, <i>por ejemplo</i> , Meprina Neprilisina PSMA	PACE4 Plasmina PSA tPA
Caspasas, <i>por ejemplo</i> .. Caspasa 1 Caspasa 2	BMP-1 MMPs por ejemplo,	Trombina Tryptasa uPA

Caspasa 3	MMP1	
Caspasa 4	MMP2	Transmembrana tipo II
Caspasa 5	MMP3	Serina proteasas (TTSP), por ejemplo, DESC1
Caspasa 6	MMP7	
Caspasa 7	MMP8	DPP-4
Caspasa 8	MMP9	FAP
Caspasa 9	MMP10	Ilepsina
Caspasa 10	MMP 11	Matriptasa-2
Caspasa 14	MMP12	MT-SPI/Matriptasa
	MMP13	TMPRSS2
Cisteína catepsinas, por ejemplo,	MMP14	TMPRSS3
Catepsina B	MMP15	TMPRSS4
Catepsina C	MMP16	
Catepsina K	MMP17	
Catepsina L	MMP19	
Catepsina S	MMP20	
Catepsina V/L2	MMP23	
Catepsina X/Z/P	MMP24	
	MMP26	
	MMP27	

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sustrato es escindible por una o más de las siguientes enzimas o proteasas: uPA, legumaina MT-SP1. ADAM 17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, MMP-9, MMP-12, MMP-13, y/o MMP-14. En algunas realizaciones, la proteasa se selecciona de entre el grupo de uPA, legumaina, y MT-SP 1. En algunas realizaciones, la proteasa es una metaloproteínasa de matriz. En algunas realizaciones, la proteasa comprende uPA. En algunas realizaciones, la proteasa comprende legumaina. En algunas realizaciones, la proteasa comprende MT-SP 1.

- 10 En algunas realizaciones, el CM se selecciona para su uso con una proteasa específica. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para al menos una proteasa seleccionada de entre el grupo que consiste en un ADAM 17, una BMP-1, una proteasa de cisteína tal como una catepsina, una HtrA I, una legumaina, un matriptasa (MT-SP 1), una metaloproteínasa de matriz (MMP), una elastasa de neutrófilos, una TMPRSS, tal como TMPRSS3 o TMPRSS4, una trombina y un activador de plasminógeno de tipo u (uPA, también denominado uroquinasa).
- 15 En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para un ADAM17. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para un BMP-1. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para una catepsina. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para una cisteína proteasa. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para una HtrA 1. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para una legumaina. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para una MT-SP1. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para una MMP. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para una elastasa de neutrófilos. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para una trombina. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para una TMPRSS. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para TMPRSS3. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para TMPRSS4. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para uPA.
- 25 En algunas realizaciones, el CM se selecciona para su uso con una proteasa específica, por ejemplo, una proteasa que se sabe que se localiza junto con la diana del anticuerpo activable. Por ejemplo, restos escindibles adecuados para su uso en los anticuerpos activables de la descripción incluyen la secuencia TGRGPSWV (SEQ ID NO: 27); SARGPSRW (SEQ ID NO: 28); TARGPSFK (SEQ ID NO: 29); LSGRSDNH (SEQ ID NO: 26); GGWHTGRN (SEQ ID NO: 30); HTGRSGAL (SEQ ID NO: 31); PLTGRSGG (SEQ ID NO: 32); AARGPAIH (SEQ ID NO: 33); RGPAFNPM (SEQ ID NO: 34); SSRCPAYL (SEQ ID NO: 35); ROPATPIM (SEQ ID NO: 36); RGPA (SEQ ID NO: 37); GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 38); FPRPILGITGL (SEQ ID NO: 39); VHMPLGFLOP (SEQ ID NO: 40); SPLTGRSG (SEQ ID NO: 41); SAGFSLPA (SEQ ID NO: 42); LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 43); SGGPLGVR (SEQ ID NO: 44); y/o PLGL (SEQ ID NO: 45).
- 30
- 35 En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para al menos una metaloproteasa de matriz MMP. Ejemplos de MMP incluyen MMP1; MMP2; MMP3; MMP7; MMP8; MMP9; MMP10; MMP11; MMP12; MMP13; MMP14; MMP15; MMP16; MMP17; MMP19; MMP20; MMP23; MMP24; MMP26; y MMP27. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para MMP9, MMP14, MMP1. MMP3, MMP13, MMP17, MMP11 y MMP19. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para MMP7. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para MMP9. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para MMP14. En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para dos o más MMP. En algunas realizaciones,
- 40

el CM es un sustrato para al menos MMP9 y MMP14. En algunas realizaciones, el CM comprende dos o más sustratos para la misma MMP. En algunas realizaciones, el CM comprende al menos dos o más sustratos de MMP9. En algunas realizaciones, el CM comprende al menos dos o más sustratos de MMP14.

- 5 En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para un MMP e incluye la secuencia ISSGLSS (SEQ ID NO: 316); QNQALRMA (SEQ ID NO: 317); AQNLLGMV (SEQ ID NO: 318); STFPFGMF (SEQ ID NO: 319); FVGYTSSL (SEQ ID NO: 320); DWLYWPG1 (SEQ ID NO: 321); MIAPVAYR (SEQ ID NO: 322); RPSPMWAY (SEQ ID NO: 21); WATPRPMR (SEQ ID NO: 323); FRLLDWQW (SEQ ID NO: 324); LKAAPRWA (SEQ ID NO: 325); GPSHLVLT (SEQ ID NO: 326); LPGGLSPW (SEQ ID NO: 327); MGLFSEAG (SEQ ID NO: 328); SPLPLRVP (SEQ ID NO: 329);
 10 RMHLRSLG (SEQ ID NO: 330); LAAPLGLL (SEQ ID NO: 331); AVGLLAPP (SEQ ID NO: 332); LLAPSHRA (SEQ ID NO: 333); PAGLWLDP (SEQ ID NO: 334); y/o 1SSGLSS (SEQ ID NO: 335).

- En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos y/o los anticuerpos activables multiespecíficos de la divulgación pueden hacerse biosintéticos utilizando tecnología y expresión de ADN recombinante en especies eucariotas o procariotas. Para los anticuerpos activables multiespecíficos los cADN que codifican el resto de enmascaramiento, la secuencia enlazadora (que puede incluir un resto escindible (CM) y la cadena de anticuerpo (pesada o ligera)) se puede enlazar en una secuencia de 5' a 3' (extremo N a C en el producto traducido) para crear la construcción de ácido nucleico, que se expresa como la proteína de anticuerpo activable multiespecífico después de un procedimiento de expresión de anticuerpo convencional. En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico podría producirse semisintéticamente mediante la expresión de un CM-anticuerpo y luego acoplar la máscara químicamente en o cerca del extremo N de la proteína. En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecífico podría producirse mediante la expresión de un anticuerpo y luego acoplar la máscara y el CM químicamente en o cerca del extremo N de la proteína de modo que el anticuerpo activable multiespecífico en el estado no escindido tenga la disposición estructural desde el extremo N hasta el extremo C de la siguiente manera: MM-CM-
 25 AB o AB-CM- MM.

- Enlazadores adecuados para su uso en las composiciones descritas en esta invención generalmente son los que proporcionan flexibilidad del AB modificado o los anticuerpos activables para facilitar la inhibición de la unión del AB a la diana. Dichos enlazadores generalmente se denominan enlazadores flexibles. Enlazadores adecuados se pueden seleccionar fácilmente y pueden ser de cualquiera de las longitudes adecuadas, tales como de 1 aminoácido *por ejemplo*, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluidos 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, 6 aminoácidos a 8 aminoácidos, o 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y puede ser 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de longitud.

- 35 Enlazadores flexibles ejemplares incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina (por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 18) y (GGGS)_n (SEQ ID NO: 19), donde n es un número entero de al menos uno, polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Polímeros de glicina y glicina-serina están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como una conexión neutra entre componentes. La glicina accede significativamente a más espacio phi-psi que incluso la alanina, y es mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (véase Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Ejemplos de enlazadores flexibles incluyen, pero no se limitan a Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 20), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 21), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 22), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 23), Gly-Gly- Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 24), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 25), y similares. El experto en la técnica reconocerá que el diseño de los anticuerpos activables puede incluir enlazadores que sean total o parcialmente flexibles, de modo que el enlazador puede incluir un enlazador flexible, así como una o más porciones que confieran una estructura menos flexible para proporcionar una estructura de anticuerpos activables multiespecíficos deseada.

- Además de los elementos descritos anteriormente, los anticuerpos activables multiespecíficos pueden contener elementos adicionales tales como, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de extremo N o C de los anticuerpos activables multiespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos activables multiespecíficos pueden incluir un resto de direccionamiento para facilitar la administración a una célula o tejido de interés. Los anticuerpos activables multiespecíficos se pueden conjugar con un agente, tal como un agente terapéutico, un agente antineoplásico, una toxina o fragmento de la misma, un resto detectable o un agente de diagnóstico. Ejemplos de agentes se describen en esta invención.

- 55 Los anticuerpos activables multiespecíficos también pueden incluir cualquiera de los agentes conjugados, enlazadores y otros componentes descritos en esta invención junto con un anticuerpo multiespecífico de la descripción, que incluye, a modo de ejemplo no taxativo, cualquiera de los agentes enumerados en la Tabla 4 y/o cualquiera de los enlazadores enumerados en la Tabla 5 y/o la Tabla 6.

60 Anticuerpos Multiespecíficos Conjugados y Anticuerpos Activables Multiespecíficos Conjugados

- La descripción también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado y/o un anticuerpo activable multiespecífico conjugado con un agente citotóxico tal como una toxina (*por ejemplo*, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (*es decir*, un radioconjugado). Agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas y derivados

de las mismas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAD, MMAF, MMAE). Por ejemplo, el agente citotóxico es monometil auristatina E. (MMAE). En algunas realizaciones, el agente es monometil auristatina D (MMAD). En algunas realizaciones, el agente es un agente seleccionado de entre el grupo enumerado en la Tabla 4. En algunas realizaciones, el agente es una dolastatina. En algunas realizaciones, el agente es una auristatina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es auristatina E o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es monometil auristatina E (MMAE). En algunas realizaciones, el agente es un maitansinoide o derivado de maitansinoide. En algunas realizaciones, el agente es DM1 o DM4. En algunas realizaciones, el agente es una duocarmicina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es una caliccamicina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es una pirrolobenzodiazepina.

Las toxinas enzimáticamente activas en los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena de difteria A, los fragmentos activos no unidos de la toxina de difteria, la cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena de ricina A, la cadena de abrina A, la cadena de modeccina A, alfa-sarcina. Proteínas de aleuritas fordii, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Una diversidad de radionucleidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{64}Cu , ^{125}I , ^{131}I , ^{131}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{90}Y , ^{186}Re y ^{89}Zr .

Conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se hacen usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de bis-flúor activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricino como se describe en Vitetta y col., Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. (Véase WO94/11026).

La Tabla 4 enumera algunos de los agentes farmacéuticos ejemplares que pueden emplearse en la divulgación descrita en esta invención, pero de ninguna manera pretende ser una lista exhaustiva.

Tabla 4: Agentes farmacéuticos ejemplares para conjugación

AGENTES CITOTÓXICOS

Auristatinas	Turbostatina
Auristatina E	Fenstatinas
Monometil auristatina D (MMAD)	Hidroxifenstatina
Monometil auristatina E (MMAE)	Spongi estatina 5
Desmetil auristatina E (DMAE)	Spongi estatina 7
Auristatina F	Hali estatina 1
Monometil auristatina F (MMAF)	Hali estatina 2
Desmetil auristatina F (DMAF)	Hali estatina 3
Derivados de auristatina, <i>por ejemplo</i> , amidas de la misma	Briostatinas modificadas
Auristatina tiramina	Halocomstatinas
Auristatina quinolina	Pirrolobencimidazoles (PBI)
Dolastatinas	Cibrostatina 6
Derivados de dolastatina	Doxaliform
Dolastatina 16 Dm J	Aálogos de antraciclinas
Dolastatina 16 Dpv	
Maitansinoides, <i>p.ej.</i> DM-1; DM-4	Análogo de cemadotina (CemCH ₂ -SH)
Derivados maitansinoides	Variante de la toxina A de <i>Pseudomonas</i> (PE38)
Duocarmicina	Variante de la toxina A de <i>Pseudomonas</i> (ZZ-PE38)
Derivados de duocarmicina	ZJ-101
Alfa-amanitin	

Antraciclinas
Doxorrubicina

- 5 Daunorrubicina
Briostatinas
Camptotecina
Derivados de camptotecina
Camptotecina 7-sustituida
10, 11-
10 Difluorometilendioxicamptotecina
Combretastatinas
Debromoaplisiatoxina
Kahalalido F
Discodermolida
15 Ecteinascidinas

ANTIVIRALES

- 20 Aciclovir
Vira A
Symmetrel

ANTIFÚNGICOS

- 25 Nistatina

ANTINEOPLÁSTICOS ADICIONALES

- 30 Adriamicina
Cerubidina
Bleomicina
Alkeran
Velban
Oncovin
35 Fluorouracilo
Metotrexato
Tiotepa
Bisantreno
Novantrona
40 Tioguanina
Procarbazina
Citarabina

ANTIBACTERIANOS

- 45 Aminoglucósidos
Estreptomina
Neomicina
Kanamicina
50 Amikacina
Gentamicina
Tobramicina
Estreptomina B
55 Espectinomicina
Ampicilina
Sulfanilamida
Polimixina
Cloramfenicol

- 60 Los expertos en la técnica reconocerán que una gran variedad de posibles restos se pueden acoplar a los anticuerpos multiespecíficos resultantes y/o anticuerpos activables multiespecíficos de la descripción. (Véase, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989)).

- 65 El acoplamiento se puede lograr mediante cualquier reacción química que unirá las dos moléculas siempre que el anticuerpo y el resto conserven sus actividades respectivas. Este enlace puede incluir muchos mecanismos químicos,

OSW-1

Derivados de 4-nitrobenciloxycarbonilo de O6-bencilguanina
Inhibidores de topoisomerasa
Hemiassterlina
Cefalotaxina
Homoharringtonina
Dímeros de pirrolobenzodiazepina (PBD)
Pirrolobenzodiazepina funcionalizada

Caliqueamicina
Podofilotoxinas
Taxanos
Alcaloides de vinca

DETECCIÓN DE CONJUGABLES REACTIVOS

Fluoresceína y derivados de la misma
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)

PRODUCTOS RADIOFARMACÉUTICOS

^{125}I
 ^{131}I
 ^{89}Zr
 ^{111}In
 ^{123}I
 ^{131}I
 $^{99\text{m}}\text{Tc}$
 ^{201}Tl
 ^{133}Xe
 ^{11}C
 ^{62}Cu
 ^{18}F
 ^{68}Ga
 ^{13}N
 ^{15}O
 ^{38}K
 ^{82}Rb
 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Tecnecio)

METALES PESADOS

Bario
Oro
Platino

ANTIMICOPLASMALES

Tilosina
Espectinomicina

por ejemplo, unión covalente, unión por afinidad, intercalación, unión coordinada y complejación. En algunas realizaciones, la unión preferida es, sin embargo, una unión covalente. La unión covalente se puede lograr mediante la condensación directa de las cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas puente externas. Muchos agentes de unión bivalentes o polivalentes son útiles para acoplar moléculas de proteínas, tales como los anticuerpos de la presente descripción, a otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametilendiaminas. Esta lista no pretende ser exhaustiva de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidas en la técnica, sino que es un ejemplo de los agentes de acoplamiento más comunes. (Véase Killen y Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen y col., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); y Vitetta y col., Science 238:1098 (1987)).

En algunas realizaciones, además de las composiciones y procedimientos proporcionados en esta invención, el anticuerpo activable conjugado también puede modificarse para la conjugación específica del sitio a través de secuencias de aminoácidos modificadas insertadas o incluidas de otro modo en la secuencia de anticuerpo activable. Estas secuencias de aminoácidos modificadas están diseñadas para permitir la colocación controlada y/o la dosificación del agente conjugado dentro de un anticuerpo activable conjugado. Por ejemplo, el anticuerpo activable puede diseñarse para incluir sustituciones de cisteína en posiciones en las cadenas ligeras y pesadas que proporcionan grupos tiol reactivos y no afectan negativamente al plegamiento y ensamblaje de proteínas, ni alteran la unión al antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo activable se puede diseñar para incluir o de otro modo introducir uno o más residuos de aminoácidos no naturales dentro del anticuerpo activable para proporcionar sitios adecuados para la conjugación. En algunas realizaciones, el anticuerpo activable puede diseñarse para incluir o introducir de otro modo secuencias peptídicas enzimáticamente activables dentro de la secuencia de anticuerpo activable.

Enlazadores adecuados son descritos en la bibliografía. (Véase, *por ejemplo*, Ramakrishnan, S. y col., Cancer Res. 44:201-208 (1984) que describe el uso de MBS (éster de M- maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida). Véase también, Patente EE.UU. N.º 5.030.719, que describe el uso de un derivado de acetilhidrazida halogenada acoplado a un anticuerpo por medio de un enlazador oligopeptídico. Enlazadores particularmente adecuados incluyen: (i) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (ii) SPDP (succinimidil-6 [3-(2-piridilditio) propionamido]hexanoato (Pierce Chem. Co., Cat#21651G); y (iii) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil-6 [3-(2- piridilditio)-propionamida] hexanoato (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G. Enlazadores adicionales incluyen, pero sin limitarse a, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB o sulfo-SPDB.

Los enlazadores descritos anteriormente contienen componentes que tienen atributos diferentes, lo que conduce a conjugados con diferentes propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, el enlazador SMPT contiene un enlace disulfuro estéricamente impedido, y puede formar conjugados con mayor estabilidad. Los enlaces disulfuro, en general, son menos estables que otros enlaces porque el enlace disulfuro se escinde *in vitro*, lo que da como resultado menos conjugado disponible.

El reactivo EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) es útil para crear una carboxamida comenzando con un ácido carboxílico y una amina primaria o secundaria. Por lo tanto, EDC se puede utilizar para enlazar residuos de lisina en un anticuerpo con un ácido carboxílico en un enlazador o toxina, o para enlazar residuos de aspartato o glutamato en un anticuerpo con una amina en un enlazador o toxina. Dichas reacciones de conjugación que utilizan EDC se pueden mejorar mediante la adición de NHS (N-hidroxisuccinimida) o sulfo-NHS (N-hidroxi-3-oxisulfonilsuccinimida). La adición de NHS o sulfo-NHS a dichas reacciones de conjugación puede mejorar la velocidad, integridad, selectividad y/o reproducibilidad de las reacciones de conjugación.

En algunas realizaciones, los enlazadores son escindibles. En algunas realizaciones, los enlazadores no son escindibles. En algunas realizaciones, están presentes dos o más enlazadores. Los dos o más enlazadores son todos iguales, es decir, escindibles o no escindibles, o los dos o más enlazadores son diferentes, es decir, al menos uno escindible y al menos uno no escindible.

La presente descripción utiliza varios procedimientos para unir agentes a Abs de los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos: (a) unión a los restos de carbohidrato de AB, o (b) unión a grupos sulfhidrilo del AB, o (c) unión a grupos amino del AB, o (d) unión a grupos carboxilato del AB. De acuerdo con la descripción, los AB pueden estar unidos covalentemente a un agente a través de un enlazador intermedio que tiene al menos dos grupos reactivos, uno para reaccionar con el AB y otro para reaccionar con el agente. El enlazador, que puede incluir cualquier compuesto orgánico compatible, se puede elegir de modo que la reacción con el AB (o agente) no afecte negativamente a la reactividad y la selectividad del AB. Además, la unión del enlazador al agente podría no destruir la actividad del agente. Enlazadores adecuados para la reacción con anticuerpos oxidados o fragmentos de anticuerpos oxidados incluyen aquellos que contienen una amina seleccionada de entre el grupo que consiste en grupos de amina primaria, amina secundaria, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina, fenilhidrazina, semicarbazida y tiosemicarbazida. Dichos grupos funcionales reactivos pueden existir como parte de la estructura del enlazador, o pueden introducirse mediante la modificación química adecuada de enlazadores que no contienen dichos grupos.

De acuerdo con la presente descripción, enlazadores adecuados para la unión a AB reducidos incluyen aquellos que

tienen ciertos grupos reactivos capaces de reaccionar con un grupo sulfhidrilo de un anticuerpo o fragmento reducido. Dichos grupos reactivos incluyen, pero sin limitarse a: grupos haloalquilo reactivos (incluyendo, por ejemplo, grupos haloacetilo), grupos p-mercuribenzoato y grupos aptos para reacciones de adición de tipo Michael (incluyendo, por ejemplo, maleimidas y grupos del tipo descrito por Mitra y Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097- 3110).

5 De acuerdo con la presente descripción, enlazadores adecuados para la unión a AB ni oxidados ni reducidos de los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos incluyen aquellos que tienen ciertos grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos amino primarios presentes en residuos de lisina no modificados en el AB. Tales grupos reactivos incluyen, pero sin limitarse a: Ésteres carboxílicos o carbónicos de NHS, ésteres carboxílicos o carbónicos de sulfo-NHS. Ésteres 4-nitrofenil carboxílico o ésteres carbónicos, ésteres pentafluorofenil carboxílicos o carbónicos, imidazoles de acilo, isocianatos e isotiocianatos.

15 De acuerdo con la presente descripción, enlazadores adecuados para la unión a AB ni oxidados ni reducidos incluyen aquellos que tienen ciertos grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos de ácido carboxílico presentes en los residuos de aspartato o glutamato en el AB, que se han activado con reactivos adecuados. Reactivos de activación adecuados incluyen EDC, con o sin NHS o sulfo-NHS agregados y otros agentes de deshidratación utilizados para la formación de carboxamida. En estos casos, los grupos funcionales presentes en los enlazadores adecuados incluirían aminas primarias y secundarias, hidrazinas, hidroxilaminas e hidrazidas.

20 El agente puede estar unido al enlazador antes o después de que el enlazador esté unido al AB. En ciertas aplicaciones, puede ser deseable producir primero un intermedio AB-enlazador en el que el enlazador esté libre de un agente asociado. Dependiendo de la aplicación particular, un agente específico puede unirse a continuación covalentemente al enlazador. En otras realizaciones, el AB se une primero al MM, CM y enlazadores asociados y a continuación se unen al enlazador para fines de conjugación.

25 *Enlazadores ramificados.* En realizaciones específicas, se utilizan enlazadores ramificados que tienen múltiples sitios para la unión de agentes. Para los enlazadores de sitios múltiples, una unión covalente única a un AB dará como resultado un intermediario AB-enlazador capaz de unirse a un agente en varios sitios. Los sitios pueden ser grupos aldehído o sulfhidrilo o cualquier sitio químico al que se puedan unir agentes.

30 Alternativamente, se puede lograr una actividad específica más alta (o una relación más alta de agentes con respecto a AB) mediante la unión de un enlazador de sitio único en una pluralidad de sitios en el AB. Esta pluralidad de sitios puede introducirse en el AB por cualquiera de los dos procedimientos. Primero, se pueden generar múltiples grupos aldehído y/o grupos sulfhidrilo en el mismo AB. En segundo lugar, se puede unir a un aldehído o sulfhidrilo del AB un "enlazador ramificado" que tiene múltiples sitios funcionales para su posterior unión a los enlazadores. Los sitios funcionales del enlazador ramificado o del enlazador de múltiples sitios pueden ser grupos aldehído o sulfhidrilo, o puede ser cualquier sitio químico al que se puedan unir los enlazadores. Se pueden obtener actividades específicas aún más altas combinando estas dos estrategias, es decir, uniendo enlazadores de múltiples sitios en varios sitios en el AB.

40 *Enlazadores escindibles:* Enlazadores peptídicos que son susceptibles a la escisión por enzimas del sistema del complemento, tales como, pero sin limitarse a, uroquinasa, activador de plasminógeno tisular, tisular, tripsina, plasmina u otra enzima que tenga actividad proteolítica pueden usarse en una realización de la presente descripción. De acuerdo con un procedimiento de la presente descripción, un agente se une a través de un enlazador susceptible de escisión por complemento.

45 El anticuerpo se selecciona de entre una clase que puede activar el complemento. Por lo tanto, el conjugado anticuerpo-agente activa la cascada del complemento y libera el agente en el sitio diana. De acuerdo con otro procedimiento de la presente descripción, un agente se une a través de un enlazador susceptible de escisión por enzimas que tienen una actividad proteolítica, tal como una uroquinasa, un activador de plasminógeno tisular, plasmina o tripsina. Estos enlazadores escindibles son útiles en anticuerpos activables conjugados que incluyen una toxina extracelular, por ejemplo, a modo de ejemplo no limitante, cualquiera de las toxinas extracelulares mostradas en la Tabla 4.

En la Tabla 5 se proporcionan ejemplos no limitantes de secuencias de enlazadores escindibles.

55 **Tabla 5: Secuencias de enlazadores ejemplares para conjugación**

Tipos de Secuencias Escindibles	Secuencias de ácidos
<u>Secuencias escindibles de plasmina</u>	
Pro-uroquinasa	
TGFβ	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 47)
	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 48)
65 Plasminógeno	SSRHRRLD (SEQ ID NO: 49)
Estafilocinasa	RKSSITIRMRVVL (SEQ ID NO: 50)

SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 51)
 SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 52)
Secuencias de factor Xa escindible

25

IEGR (SEQ ID NO: 53)
 IDGR i (SEQ ID NO: 54)
 GGSIDGR (SEQ ID NO: 55)

PLGLWA (SEQ ID NO: 56)

5 Secuencias escindibles de MMP

Gelatinasa A

Secuencias escindibles de collagenasa

Colágeno de piel de ternera (cadena $\alpha 1$ (I))

Colágeno de piel de ternera (cadena $\alpha 2$ (I))

10 Colágeno de cartílago bovino (cadena $\alpha 1$ (II))

Colágeno hepático humano (cadena $\alpha 1$ (III))

$\alpha 2$ M humano

PZP humano

15 $\alpha 1$ M de Rata

$\alpha 2$ M de Rata

$\alpha 1$ (2J) de Rata

20 $\alpha 1$ (3J) de Rata

Colagenasa de fibroblasto humano

(escisiones autolíticas)

GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 57)

GPQGLLGA (SEQ ID NO: 58)

CIAGQ (SEQ ID NO: 59)

GPLGIAGI (SEQ ID NO: 60)

GPEGLRVG (SEQ ID NO: 61)

YGAGLGVV (SEQ ID NO: 62)

AGLGVVER (SEQ ID NO: 63)

AGLGSST (SEQ ID NO: 64)

EPQALAMS (SEQ ID NO: 65)

QALAMSAI (SEQ ID NO: 66)

AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 67)

MDAFLESS (SEQ ID NO: 68)

ESLPVVAV (SEQ ID NO: 69)

SAPAVESE (SEQ ID NO: 70)

DVAQFVLT (SEQ ID NO: 71)

VAQFVLTE (SEQ ID NO: 72)

AQFVLTEG (SEQ ID NO: 73)

PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 74)

Además, los agentes pueden unirse mediante enlaces disulfuro (por ejemplo, los enlaces disulfuro en una molécula de cisteína) al AB. Dado que muchos tumores liberan naturalmente altos niveles de glutatión (un agente reductor), esto puede reducir los enlaces disulfuro con la posterior liberación del agente en el sitio de administración. En algunas realizaciones, el agente reductor que modificaría un CM también modificaría el enlazador del anticuerpo activable conjugado.

Espaciadores y Elementos Escindibles: En algunas realizaciones, puede ser necesario construir el enlazador de tal manera que se optimice el espacio entre el agente y el AB del anticuerpo activable. Esto se puede lograr mediante el uso de un enlazador de estructura general:

W-(CH₂)_n-Q

donde

W es --NH--CH₂-- o --CH₂--;

Q es un aminoácido, péptido; y

n es un número entero de 0 a 20.

En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender un elemento espaciador y un elemento escindible. El elemento espaciador sirve para posicionar el elemento escindible lejos del núcleo del AB de manera que el elemento escindible sea más accesible para la enzima responsable de la escisión. Algunos de los enlazadores ramificados descritos anteriormente pueden servir como elementos espaciadores.

A lo largo de este análisis, debe entenderse que la unión del enlazador al agente (o del elemento espaciador al elemento escindible, o elemento escindible al agente) no necesita ser un modo particular de unión o reacción. Cualquier reacción que proporcione un producto de estabilidad y compatibilidad biológica adecuadas es aceptable.

Complemento de suero y selección de enlazadores: Según un procedimiento de la presente descripción, cuando se desea la liberación de un agente, se usa un AB que es un anticuerpo de una clase que puede activar el complemento. El conjugado resultante conserva tanto la capacidad de unirse al antígeno como la activación de la cascada del complemento. Por lo tanto, según esta realización de la presente descripción, un agente se une a un extremo del enlazador escindible o el elemento escindible y el otro extremo del grupo enlazador se une a un sitio específico en el AB. Por ejemplo, si el agente tiene un grupo hidroxilo o un grupo amino, puede estar unido al extremo carboxi de un péptido, aminoácido u otro enlazador adecuadamente elegido a través de un enlace éster o amida, respectivamente. Por ejemplo, dichos agentes pueden unirse al péptido enlazador mediante una reacción de carbodimida. Si el agente contiene grupos funcionales que interferirán con la unión al enlazador, estos grupos funcionales de interferencia pueden bloquearse antes de la unión y desbloquearse una vez que se realiza el producto conjugado o intermedio. A continuación, el extremo opuesto o amino del enlazador se usa directamente o después de una modificación adicional para la unión a un AB que es capaz de activar el complemento.

Los enlazadores (o elementos espaciadores de los enlazadores) pueden tener cualquier longitud deseada, un extremo

de los cuales puede unirse covalentemente a sitios específicos en el AB del anticuerpo activable. El otro extremo del enlazador o elemento espaciador puede estar unido a un enlazador aminoacídico o peptídico.

- 5 Por lo tanto, cuando estos conjugados se unen al antígeno en presencia del complemento, el enlace amida o éster que une el agente al enlazador se escindirán, dando como resultado la liberación del agente en su forma activa. Estos conjugados, cuando se administran a un sujeto, lograrán la administración y liberación del agente en el sitio diana, y son particularmente efectivos para la administración in vivo de agentes farmacéuticos, antibióticos, antimetabolitos, agentes antiproliferativos y similares, como se presentan, pero sin limitarse a, los de la Tabla 4.
- 10 *Enlazadores para liberación sin activación del complemento.* En aún otra aplicación de administración dirigida, se desea la liberación del agente sin activación del complemento ya que la activación de la cascada del complemento finalmente lisará la célula diana. Por lo tanto, este enfoque es útil cuando la administración y liberación del agente debe realizarse sin destruir la célula diana. Este es el objetivo cuando se desea la administración de mediadores celulares tales como hormonas, enzimas, corticosteroides, neurotransmisores, genes o enzimas a las células dianas.
- 15 Estos conjugados pueden prepararse uniendo el agente a un AB que no es capaz de activar el complemento a través de un enlazador que es ligeramente susceptible a la escisión por las proteasas séricas. Cuando este conjugado se administra a un individuo, los complejos antígeno-anticuerpo se formarán rápidamente, mientras que la escisión del agente se producirá lentamente, lo que dará como resultado la liberación del compuesto en el sitio diana.
- 20 *Reticuladores bioquímicos.* En algunas realizaciones, el anticuerpo activable puede conjugarse con uno o más agentes terapéuticos usando ciertos reticuladores bioquímicos. Los reactivos de reticulación forman puentes moleculares que unen grupos funcionales de dos moléculas diferentes. Para unir dos proteínas diferentes de forma escalonada, se pueden usar reticuladores heterobifuncionales que eliminen la formación de homopolímeros no deseados.
- 25 Los enlazadores de peptidilo escindibles por proteasas lisosómicas también son útiles, por ejemplo, Val-Cit, Val-Ala u otros dipéptidos. Además, los enlazadores lábiles al ácido se pueden escindir en el entorno de bajo pH del lisosoma, por ejemplo: bis-sialil éter. Otros enlazadores adecuados incluyen sustratos lábiles a cathepsina, particularmente aquellos que muestran una función óptima a un pH ácido.
- 30 Se hace referencia a reticuladores heterobifuncionales ejemplares en la Tabla 6.

Tabla 6: Reticuladores Hetero-Bifuncionales Ejemplares

RETICULADORES HETERO-BIFUNCIONALES			
Enlazador	Reactivo a	Ventajas y aplicaciones	Longitud del Brazo Espaciador después de reticulación (Angstroms)
SMPT	Aminas primarias	Mayor estabilidad	11,2 A
SPDP	Sulfhidrilos Aminas primarias	Tiolación	6,8 A
LC-SPDP	Aminas primarias	Brazo espaciador extendido	15,6 A
Sulfo-LC-SPDP	Aminas primarias	Brazo espaciador extendido	15,6 A
SMCC	Aminas primarias	Grupo reactivo de maleimida estable	11,6 A
	Sulfhidrilos	Conjugación enzima-anticuerpo Conjugación de proteína Hapteno-vehículo	
Sulfo-SMCC	Aminas primarias	Grupo reactivo de maleimida estable	11,6 A
	Sulfhidrilos	Soluble en agua	
MBS	Aminas primarias	Conjugación enzima-anticuerpo	9,9 A
Sulfo-MBS	Sulfhidrilos Aminas primarias	Conjugación de proteína hapteno- Soluble en agua	9,9 A

SIAB	Aminas primarias	Conjugación de enzima-anticuerpo	10,6 Å
	Sulfhidrilos		
Sulfo-SIAB	Aminas primarias	Soluble en agua	10,6 Å
SMPB	Aminas primarias	Brazo espaciador extendido	14,5 Å
Sulfo-SMPB	Aminas primarias	Brazo espaciador extendido	14,5 Å
EDE/Sulfo-NHS	Aminas primarias	Conjugación de hapteno-vehículo	0
ABH	Carbohidratos	Reacciona con grupos de azúcar	11,9 Å
	No selectivo		

Enlazadores No-Escindibles o Unión Directa: En algunas otras realizaciones de la descripción, el conjugado puede diseñarse de modo que el agente se administre a la diana pero no se libere. Esto puede lograrse uniendo un agente a un AB directamente o mediante un enlazador no escindible.

5 Estos enlazadores no escindibles pueden incluir aminoácidos, péptidos, D-aminoácidos u otros compuestos orgánicos que pueden modificarse para incluir grupos funcionales que posteriormente pueden utilizarse en la unión a AB por los procedimientos descritos en esta invención. Una fórmula general para un enlazador orgánico de este tipo podría ser

10 $W-(CH_2)_n-Q$

donde

W es $-NH-CH_2-$ o $-CH_2-$;

Q es un aminoácido, péptido; y

15 n es un número entero de 0 a 20.

Conjugados no Escindibles: De manera alternativa, un compuesto se puede unir a AB que no activan el complemento. Cuando se usan AB que son incapaces de activar el complemento, esta unión se puede lograr usando enlazadores que sean susceptibles de escisión por complemento activado o usando enlazadores que no sean susceptibles de escisión por complemento activado.

20 Los anticuerpos descritos en esta invención también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y Patente EE. UU. No. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en la Patente EE.UU. N.º 5.013.556.

30 Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente descripción pueden conjugarse con los liposomas como se describe en Martin y col., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de disulfida-intercambio.

35 Anticuerpos Activables Multiespecíficos que tienen Restos Estéricos No Ligante o Parejas de Unión para Restos Estéricos No Ligantes

La descripción también proporciona anticuerpos activables que incluyen restos estéricos no ligantes (NB) o parejas de unión (BP) para restos estéricos no ligantes, donde el BP recluta o atrae de otro modo el NB al anticuerpo activable. Los anticuerpos activables multiespecíficos proporcionados en esta invención incluyen, por ejemplo, un anticuerpo activable multiespecífico que incluye un resto estérico no ligante (NB), un enlazador escindible (CL) y al menos un primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB1) que se une a una primera diana o epítopo; un anticuerpo activable multiespecífico que incluye una pareja de unión para un resto estérico no ligante (BP), un CL y un AB1; y un anticuerpo activable multiespecífico que incluye un BP para el que se ha reclutado un NB, un CL y un AB1 que se une a la primera diana o epítopo. Los anticuerpos activables multiespecíficos en los que el NB está unido covalentemente al CL y al AB1 o está asociado por interacción con un BP que está unido covalentemente al CL y al AB1 se denominan en esta invención "anticuerpos activables multiespecíficos que contienen NB". Por activable o conmutable se entiende que el anticuerpo activable exhibe un primer nivel de unión a una diana cuando el anticuerpo activable está en un estado inhibido, enmascarado o no escindido (es decir, una primera conformación), y un segundo nivel de unión a la diana cuando el anticuerpo activable está en un estado no inhibido, no enmascarado y/o escindido (es decir, una segunda conformación, es decir, un anticuerpo activado), donde el segundo nivel de unión a la diana es mayor que el primer

nivel de unión a la diana. Las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos pueden exhibir una biodisponibilidad aumentada y una biodistribución más favorable en comparación con los productos terapéuticos de anticuerpos convencionales.

- 5 En algunas realizaciones, los anticuerpos activables multiespecíficos proporcionan una toxicidad reducida y/o efectos secundarios adversos que de otro modo podrían ser resultado de la unión en sitios sin tratamiento y/o sitios de diagnóstico si el anticuerpo activable multiespecífico no se enmascara o se inhibe de otro modo la unión a tal sitio. '

10 En una realización, el anticuerpo activable multiespecífico incluye *un* resto estérico no ligante (NB); un enlazador de escindible (CL); y al menos un primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB1) que se une específicamente a una primera diana o epítipo, donde el NB es un polipéptido que no se une específicamente al AB1; el CL es un polipéptido que incluye un sustrato (S) para una enzima; el CL está posicionado de tal manera que en un estado no escindido, el NB interfiere con la unión del AB1 a su diana y en un estado escindido, el NB no interfiere con la unión del AB1 a su diana; y el NB no inhibe la escisión del CL por la enzima. Tal como se usa en esta invención y en toda la presente, el

15 término polipéptido se refiere a cualquier polipéptido que incluye al menos dos residuos de aminoácidos, incluyendo polipéptidos más grandes, proteínas de longitud completa y fragmentos del mismo, el término polipéptido no se limita polipéptidos de cadena única y puede incluir polipéptidos multi-conjunto, por ejemplo, multi-cadenas. En los casos en que el polipéptido es de una longitud más corta, por ejemplo, menos de 50 aminoácidos en total, los términos péptido y polipéptido se utilizan indistintamente en esta invención y en los casos en que el polipéptido es de una longitud más

20 larga, por ejemplo, 50 aminoácidos o más, los términos polipéptido y proteína se usan indistintamente en esta invención.

En una realización, el anticuerpo activable multiespecífico incluye un resto estérico no ligante (NB); un enlazador escindible (CL); y al menos un primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB1) que se une específicamente a una

25 primera diana o epítipo, donde (i) el NB incluye un polipéptido que no se une específicamente al AB1; (ii) el CL es un polipéptido de hasta 50 aminoácidos de longitud que incluye un sustrato (S) para una enzima; (iii) el CL está posicionado de manera que en un estado no escindido, el NB interfiere con la unión del AB1 a su diana y en un estado escindido, el NB no interfiere con la unión del AB1 a su diana; y (iv) el NB no inhibe la escisión del CL por la enzima. Por ejemplo, el CL tiene una longitud de hasta 15 aminoácidos, una longitud de hasta 20 aminoácidos, una longitud

30 de hasta 25 aminoácidos, una longitud de hasta 30 aminoácidos, una longitud de hasta 35 aminoácidos, una longitud de hasta 40 aminoácidos, una longitud de hasta 45 aminoácidos, una longitud de hasta 50 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 10-50 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 15-50 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 20-50 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 25-50 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 30-50 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 35-50 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 40-50 aminoácidos,

35 una longitud en el intervalo de 45-50 aminoácidos a longitud en el intervalo de 10-40 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 15-40 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 20-40 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 25-40 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 30-40 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 35-40 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 10-30 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 15-30 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 20-30 aminoácidos, una longitud en el intervalo de 25-30 aminoácidos, una longitud en el intervalo de

40 10-20 aminoácidos, o una longitud en el intervalo de 10-15 aminoácidos.

En una realización, el anticuerpo activable multiespecífico incluye un resto estérico no ligante (NB); un enlazador escindible (CL); y al menos un primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB1) que se une específicamente a una

45 primera diana o epítipo, donde (i) el NB incluye: un polipéptido que no se une específicamente al AB1; (ii) el CL es un polipéptido que incluye un sustrato (S) para una enzima; (iii) el CL está posicionado de manera que en un estado no escindido, el NB interfiere con la unión del AB1 a su diana y en un estado escindido, el NB no interfiere con la unión del AB1 a su diana; (iv) el NB no inhibe la escisión del CL por la enzima; y (v) al menos una porción del anticuerpo multiespecífico tiene la disposición estructural de extremo N al extremo C de la siguiente manera en el estado no escindido: NB-CL-AB1 o AB1-CL-NB.

50 En una realización, (el anticuerpo activable multiespecífico incluye un resto estérico no ligante (NB); un enlazador escindible (CL); y al menos un primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB1) que se une específicamente a una primera diana o epítipo, donde (i) el NB incluye un polipéptido que no se une específicamente al AB1; (ii) el CL es un polipéptido que incluye un sustrato (S) para una enzima; (iii) el CL está posicionado de tal manera que en un estado

55 no escindido, el NB interfiere con la unión del AB1 a su diana y en un estado escindido, el NB no interfiere con la unión del AB1 a su diana, y donde el NB en el anticuerpo activable no escindido reduce la capacidad del AB1 para unirse a su diana en al menos 50 %, por ejemplo, en al menos 60 %, en al menos 70 %, en al menos 75 %, en al menos 80 %, en al menos 85 %, en al menos 90 %, en al menos 95 %, en al menos 96 %, en al menos 97 %, en al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 100 % en comparación con la capacidad del AB1 escindido para unirse a su diana; y (iv) el NB

60 no inhibe la escisión del CL por la enzima. La reducción en la capacidad del AB para unirse a su diana se determina, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo como se describe en esta invención o un ensayo de desplazamiento de diana *in vivo* tal como, por ejemplo, el ensayo descrito en las publicaciones PCT nº WO 2009/025846 y WO 2010/081173.

65 En una realización, el anticuerpo activable multiespecífico incluye un pareja de unión (BP) para un resto estérico no ligante (NB); un enlazador escindible (CL); y al menos un primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB1) que se

une específicamente a una primera diana y/o epítopo, donde el BP es un polipéptido que se une al NB cuando se expone al mismo: el NB no se une específicamente al AB1; el CL es un polipéptido que incluye un sustrato (S) para una enzima; el CL se coloca de manera que en un estado no escindido en presencia del NB. el NB interfiere con la unión del AB a la diana y en un estado escindido, el NB no interfiere con la unión del AB a la diana y el BP no interfiere con la unión del AB a la diana; y el NB y el BP no inhiben la escisión de la CL por la enzima. En algunos ejemplos de esta realización, la BP del anticuerpo activable se une opcionalmente al NB. En una realización, el NB es reclutado por el BP del anticuerpo activable in vivo.

En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, el anticuerpo activable multiespecífico se formula como una composición. En algunas de estas realizaciones, la composición también incluye el NB, donde el NB se coformula con el anticuerpo activable multiespecífico que incluye el BP, el CL. y el AB. En algunos ejemplos de esta realización, el BP se selecciona de entre el grupo que consiste en un péptido de unión a albúmina, un péptido de unión a fibrinógeno, un péptido de unión a fibronectina, un péptido de unión a hemoglobina, un péptido de unión a transferrina, un péptido de unión al dominio de inmunoglobulina y otros péptidos de unión a proteína sérica.

En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, el NB es una proteína globular soluble. En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, el NB es una proteína que circula en el torrente sanguíneo. En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, el NB se selecciona de entre el grupo que consiste en albúmina, fibrinógeno, fibronectina, hemoglobina, transferrina, un dominio de inmunoglobulina y otras proteínas séricas.

En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, el CL es un polipéptido que incluye un sustrato (S) para una proteasa. En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, la proteasa se localiza conjuntamente con su diana en un tejido, y la proteasa escinde el CL en el anticuerpo activable multiespecífico cuando el anticuerpo activable multiespecífico se expone a la proteasa. En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, el CL es un polipéptido de hasta 50 aminoácidos de longitud. En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, el CL es un polipéptido que incluye un sustrato (S) que tiene una longitud de hasta 15 aminoácidos, por ejemplo, 3 aminoácidos de longitud, 4 aminoácidos de longitud, 5 aminoácidos de longitud, 6 aminoácidos de longitud, 7 aminoácidos de longitud, 8 aminoácidos de longitud, 9 aminoácidos de longitud, 10 aminoácidos de longitud, 11 aminoácidos de longitud, 12 aminoácidos longitud, 13 aminoácidos de longitud, 14 aminoácidos de longitud o 15 aminoácidos de longitud.

En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, al menos una porción del anticuerpo activable multiespecífico tiene la disposición estructural del extremo N extremo C de la siguiente manera en el estado no escindido: NB-CL-AB, AB-CL-NB, BP-CL-AB o AB-CL-BP. En realizaciones donde el anticuerpo activable multiespecífico incluye un BP y el anticuerpo activable multiespecífico está en presencia del NB correspondiente, al menos una porción del anticuerpo activable multiespecífico tiene una disposición estructural desde el extremo N al extremo C de la siguiente manera en el estado no escindido: NB:BP-CM-AB o AB-CM-BP:NB, donde ":" representa una interacción, *por ejemplo*, unión, entre el NB y BP.

En algunos ejemplos de una de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico. el anticuerpo activable multiespecífico incluye un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a su diana y es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo de dominio, cadena simple, fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un scFv, una costra, un dAb, un anticuerpo de cadena pesada de dominio simple y un anticuerpo de cadena ligera de dominio simple. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a su diana es un anticuerpo monoclonal de ratón, quimérico, humanizado o completamente humano.

En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, el anticuerpo activable multiespecífico también incluye un agente conjugado con el AB. En algunas realizaciones, el agente es un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente es un agente antineoplásico. En algunas realizaciones, el agente es una toxina o fragmento de la misma. En algunas realizaciones, el agente se conjuga con el AB a través de un enlazador. En algunas realizaciones, el enlazador es unenlazador escindible. En algunas realizaciones, el agente es un agente seleccionado de entre el grupo enumerado en la Tabla 4. En algunas realizaciones, el agente es una dolastatina. En algunas realizaciones, el agente es una auristatina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es auristatina E o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es monometil auristatina E (MMAE). En algunas realizaciones, el agente es monometil auristatina D (MMAD). En algunas realizaciones, el agente es un maitansinoide o un derivado de maitansinoide. En algunas realizaciones, el agente es DM1 o DM4. En algunas realizaciones, el agente es una duocarmicina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es una caliqueamicina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es una pirrolobenzodiazepina.

En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, el anticuerpo activable multiespecífico también incluye un resto detectable. En algunas realizaciones, el resto detectable es un

agente de diagnóstico.

En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpos activables multiespecíficos, el anticuerpo activable multiespecífico también incluye un espaciador. En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, el anticuerpo activable multiespecífico también incluye un péptido señal. En algunas realizaciones, el péptido señal se conjuga con el anticuerpo activable multiespecífico a través de un espaciador. En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, el espaciador se une directamente al MM del anticuerpo activable multiespecífico.

En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable es mayor que la del anticuerpo multiespecífico correspondiente; por ejemplo, la pK del anticuerpo activable multiespecífico es mayor que la del anticuerpo multiespecífico correspondiente. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es similar a la del anticuerpo multiespecífico correspondiente. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 15 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 12 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 11 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 10 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 9 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 8 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 7 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 6 días cuando se administra a un organismo. En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 5 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 4 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 3 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 2 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 24 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 20 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 18 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 16 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 14 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 12 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 10 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 8 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 6 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 4 horas cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecífico es de al menos 3 horas cuando se administra a un organismo.

La descripción también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo activable multiespecífico descrito en esta invención, así como vectores que incluyen estas secuencias de ácido nucleico aisladas. La descripción proporciona procedimientos para producir un anticuerpo activable multiespecífico cultivando una célula en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo activable multiespecífico, donde la célula comprende tal molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la célula comprende tal vector.

La constante de disociación (K_d) del anticuerpo activable multiespecífico que contiene NB hacia la diana es mayor que la K_d del AB hacia la diana cuando no está asociado con el NB o NB:BP. La constante de disociación (K_d) del anticuerpo activable multiespecífico que contiene NB hacia la diana es mayor que la K_d del AB original hacia la diana. Por ejemplo, la K_d del anticuerpo activable multiespecífico que contiene NB hacia la diana es al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o más, o entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1000000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1.000-10.000.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 veces, mayor que la del AB cuando no está asociado con el NB o NB:BP o el K_d del AB original hacia la diana. Por el contrario, la afinidad de unión del anticuerpo activable multiespecífico que contiene NB hacia la diana es inferior a la afinidad de unión del AB cuando no está asociado con el NB o NB:BP o menor que la afinidad de unión del AB original hacia la diana. Por ejemplo, la afinidad de unión del anticuerpo activable multiespecífico que contiene NB a la diana es de al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o mayor o entre 5-10, 10-100, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1.000-10.000.000, 10.000-

100.000, 10.000- 1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 veces menor que la afinidad de unión del AB cuando no está asociado con el NB o NB:BP o menor que la afinidad de unión del AB original hacia la diana,

- 5 Cuando el anticuerpo activable multiespecífico de NB está en presencia de su diana, la unión específica del AB a su diana se reduce o inhibe, en comparación con la unión específica del AB cuando no está asociado con el NB o NB:BP. Cuando el anticuerpo activable multiespecífico que contiene NB está en presencia de su diana, la unión específica del AB a su diana se reduce o inhibe, en comparación con la unión específica del AB original a su diana. Cuando se compara con la unión del AB no asociada con un NB o NB:BP o la unión del AB original a su diana, la capacidad del anticuerpo activable multiespecífico que contiene NB para unirse a su diana se reduce, por ejemplo, en al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso 100 % durante al menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 o 96 horas, o 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 180 días, o 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses o más cuando se mide *in vitro* y/o *in vivo*.
- 10
- 15 Cuando el anticuerpo activable multiespecífico que contiene NB está en presencia de su diana pero no en presencia de un agente modificador (por ejemplo, una proteasa u otra enzima), la unión específica del AB a su diana se reduce o inhibe, en comparación con la unión específica del AB cuando no está asociado con el NB o NB:BP. Cuando el anticuerpo activable multiespecífico que contiene NB está en presencia de su diana pero no en presencia de un agente modificador (por ejemplo, una proteasa, otra enzima, agente de reducción o luz), la unión específica del AB a su diana se reduce o inhibe, en comparación con la unión específica del AB original a su diana. En comparación con la unión del AB no asociada con un NB o NB:BP o la unión del AB original a su diana, la capacidad del anticuerpo activable multiespecífico que contiene NB de unirse a su diana se reduce, por ejemplo, en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o incluso al 100 % durante al menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, o 96 horas, o 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 180 días, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses o menos cuando se mide *in vitro* y/o *in vivo*.
- 20
- 25

En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpo activable multiespecífico, el anticuerpo activable multiespecífico incluye un agente conjugado con el AB para producir un conjugado de anticuerpo activable multiespecífico. En algunas realizaciones del conjugado de anticuerpo activable multiespecífico, el agente es un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente es un agente de diagnóstico. En algunas realizaciones, el agente es un marcador detectable. En algunas realizaciones del conjugado de anticuerpo activable multiespecífico, el agente es un agente antineoplásico. En algunas realizaciones del conjugado de anticuerpo activable multiespecífico, el agente es una toxina o fragmento de la misma. En algunas realizaciones del anticuerpo activable conjugado de la invención, el agente está conjugado con el AB a través de un enlazador. En algunas realizaciones del conjugado del anticuerpo activable multiespecífico, el enlazador es un enlazador escindible. En algunas realizaciones, el agente es un agente seleccionado de entre el grupo enumerado en la Tabla 4. En algunas realizaciones, el agente es una dolastatina. En algunas realizaciones, el agente es una auristatina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es auristatina E o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es monometil auristatina E (MMAE). En algunas realizaciones, el agente es monometil auristatina D (MMAD). En algunas realizaciones, el agente es un maitansinoide o derivado de maitansinoide. En algunas realizaciones, el agente es DM1 o DM4. En algunas realizaciones, el agente es una duocarmicina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es una caliqueamicina o derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente es una pirrolobenzodiazepina.

- 45 En algunos ejemplos de cualquiera de estas realizaciones de anticuerpos activables multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos son anticuerpos activables multiespecíficos de unión a diana dual. Dichos anticuerpos activables multiespecíficos de unión a diana dual contienen dos Abs que pueden unirse a la misma diana o a dianas diferentes. En realizaciones específicas, los anticuerpos activables multiespecíficos de doble direccionamiento contienen anticuerpos biespecíficos o fragmentos de anticuerpos.
- 50

Anticuerpos activables multiespecíficos de unión a dianas duales están diseñados para tener un CL escindible por un agente de escisión que está colocalizado en un tejido diana con una o ambas de las dianas capaces de unirse a los AB de los anticuerpos activables multiespecíficos. Se pueden diseñar anticuerpos activables multiespecíficos de unión a diana dual con más de más de un AB para la misma o diferentes dianas para tener más de un CL, donde el primer CL es escindible por un agente de escisión en un primer tejido diana y donde el segundo CL es escindible por un agente de escisión en un segundo tejido diana, con uno o más de las dianas que se unen a los AB de los anticuerpos activables multiespecíficos. En una realización, el primer y segundo tejido diana están separados espacialmente, por ejemplo, en diferentes sitios del organismo. En una realización, el primer y el segundo tejido diana están separados temporalmente por el mismo tejido, por ejemplo, el mismo tejido en dos puntos de tiempo diferentes, por ejemplo, el primer punto de tiempo es cuando el tejido es un tumor en etapa temprana, y el segundo punto de tiempo es cuando el tejido es un tumor en etapa tardía.

- La descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos activables multiespecíficos descritos en esta invención. La descripción también proporciona vectores que incluyen estos ácidos nucleicos. Los anticuerpos activables multiespecíficos descritos en esta invención se producen mediante el cultivo de una célula en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo activable multiespecífico, donde la célula incluye
- 65

estas moléculas o vectores de ácido nucleico.

La descripción también proporciona procedimientos para fabricar anticuerpos activables multiespecíficos. En una realización, el procedimiento incluye las etapas de (a) cultivar una célula que incluye una construcción de ácido nucleico que codifica el anticuerpo activable multiespecífico en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo activable multiespecífico, donde el anticuerpo activable multiespecífico incluye (i) un resto estérico no ligante (NB); (ii) un enlazador escindible (CL); y (iii) un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo (AB) que se une específicamente a una diana, donde (1) el NB no se une específicamente al AB; (2) el CL es un polipéptido que incluye un sustrato (S) para una enzima; (3) el CL se coloca de manera que en un estado no escindido, el NB interfiere con la unión del AB a la diana y en un estado escindido, el NB no interfiere con la unión del AB a la diana; y (4) el NB no inhibe la escisión de la enzima por medio de la enzima; y (b) se recupera el anticuerpo activable multiespecífico.

En otra realización, el procedimiento incluye las etapas de (a) cultivo de una célula que incluye una construcción de ácido nucleico que codifica el anticuerpo activable multiespecífico en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo activable multiespecífico, donde el anticuerpo activable multiespecífico incluye (i) un par de unión (BP) para un resto estérico no ligante (NB); (ii) un enlazador escindible (CL); y (iii) un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo (AB) que se une específicamente a una diana, donde (1) el NB no se une específicamente al AB; (2) el CL es un polipéptido que incluye un sustrato (S) para una enzima; (3) el CL se coloca de manera que en un estado no escindido en presencia del NB, el NB interfiere con la unión del AB a la diana y en un estado escindido, el NB no interfiere con la unión del AB a la diana y el BP no interfiere con la unión del AB a la diana; y (4) el NB y el BP no inhiben la escisión del CL por la enzima; y (b) se recupera el anticuerpo activable multiespecífico. En algunos ejemplos, de esta realización, el BP del anticuerpo activable multiespecífico se une al NB.

Uso de Anticuerpos Multiespecíficos y de Anticuerpos Activables Multiespecíficos

Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas según la descripción se administrará con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan a las formulaciones para proporcionar una mejor transferencia, administración, tolerancia y similares. Se pueden encontrar una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (15ª ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularmente el Capítulo 87 de Blaug, Seymour, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, lípidos (catiónicos o aniónicos) que contienen vesículas (tales como Lipofectin™). Conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contengan carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias según la presente descripción, siempre que el principio activo en la formulación no sea inactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance". Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000). Wang W, "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2): 1-60 (2000). Channan WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell y col. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) y las citaciones en el mismo para información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

En una realización, un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico de la divulgación se pueden utilizar como agentes terapéuticos. Dichos agentes generalmente se emplearán para diagnosticar, pronosticar, monitorear, tratar, aliviar y/o impedir una enfermedad o patología en un sujeto. Un régimen terapéutico se lleva a cabo mediante la identificación de un sujeto, por ejemplo, un paciente humano u otro mamífero que padece (o corre el riesgo de desarrollar) un trastorno utilizando procedimientos estándar. Un anticuerpo multiespecífico y/o una preparación de anticuerpo activable multiespecífico, por ejemplo, en algunas realizaciones, una que tiene alta especificidad y alta afinidad por sus dos o más antígenos diana, se administra al sujeto y generalmente tendrá un efecto debido a su unión con las dianas. La administración del anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico puede anular o inhibir o interferir con la función de señalización de una o más de las dianas. La administración del anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico puede anular o inhibir o interferir con la unión de una o más de las dianas con un ligando endógeno al que se une naturalmente.

En general, el alivio o tratamiento de una enfermedad o trastorno implica la disminución de uno o más síntomas o problemas médicos asociados con la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, en el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede lograr uno o una combinación de lo siguientes: reducir la cantidad de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, disminuir en cierta medida y/o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En algunas realizaciones, se puede utilizar una composición de esta descripción para impedir la aparición o reaparición de la enfermedad o trastorno en un sujeto, *por ejemplo*, un ser humano u otro mamífero, tal como un primate no humano, un animal de compañía (*por ejemplo*, gato, perro, caballo), un animal de granja, un animal de trabajo o un animal de zoológico. Los términos sujeto y paciente se usan indistintamente en esta invención.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción se refiere generalmente a la cantidad necesaria para lograr un objetivo terapéutico. Como se señaló anteriormente, esto puede ser una interacción de unión entre el anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico y sus antígenos diana que, en determinados casos, interfiere con el funcionamiento de las dianas. La cantidad que se requiere administrar dependerá además de la afinidad de unión del anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico para su antígeno específico, y también dependerá de la velocidad a la que un anticuerpo multiespecífico administrado y/o un anticuerpo activable multiespecífico se agota del volumen libre de otro sujeto al que se administra. Intervalos comunes para la dosificación terapéuticamente efectiva de un anticuerpo multiespecífico y/o fragmento de anticuerpo y/o un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción pueden ser, a modo de ejemplo no taxativo, de alrededor de 0,1 mg/kg de peso corporal a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal. Frecuencias de dosificación comunes pueden variar, por ejemplo, de dos veces al día a una vez a la semana.

La eficacia del tratamiento se determina en asociación con cualquier procedimiento conocido para diagnosticar o tratar el trastorno particular. Procedimientos para la detección de anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos que poseen la especificidad deseada incluyen, pero sin limitarse a, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y otras técnicas inmunológicamente mediadas conocidas en la técnica.

En otra realización, un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico dirigidos a dos o más dianas son utilizados en procedimientos conocidos dentro de la técnica relacionados con la localización y/o cuantificación de las dianas (por ejemplo, para su uso en la medición de niveles de una o más de las dianas dentro de muestras fisiológicas apropiadas, para su uso en procedimientos de diagnóstico, para su uso en imagenología de proteínas y similares). En una realización dada, un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico dirigido a dos o más dianas, o un derivado, fragmento, análogo u homólogo del mismo, que contienen el dominio de unión al antígeno derivado del anticuerpo, se utilizan como compuestos farmacológicamente activos (denominados en lo sucesivo «terapéuticos»).

En otra realización, se utiliza un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico dirigido a dos o más dianas para aislar una o más de las dianas mediante técnicas estándar, tales como inmunoafinidad, cromatografía o inmunoprecipitación. Un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico dirigido a dos o más dianas para un fragmento del mismo) se utilizan de forma diagnóstica para monitorear los niveles de proteína en el tejido como parte de un procedimiento de prueba clínica, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento (es decir, unión física) del anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

En aun otra realización, se puede usar un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico dirigido a dos o más dianas como un agente para detectar la presencia de una o más de las dianas (o un fragmento de las mismas) en una muestra. En algunas realizaciones, el anticuerpo contiene una etiqueta detectable. Los anticuerpos son policlonales o, en algunas realizaciones, monoclonales. Se usa un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, F_{ab} , scFv, o $F_{(ab)}2$). El término "marcado", con respecto a la sonda o el anticuerpo, pretende incluir el marcado directo de la sonda o el anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable a la sonda o el anticuerpo, así como el marcado indirecto de la sonda o el anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Ejemplos de marcado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y el marcado final de una sonda de con biotina de modo que pueda detectarse con estreptavidina marcada con fluorescencia. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto, incluidos dentro del uso del término "muestra biológica", por lo tanto, está la sangre y una fracción o componente de sangre que incluye suero sanguíneo, plasma sanguíneo o linfa. Es decir, el procedimiento de detección de la descripción se puede usar para detectar una proteína en una muestra biológica *in vitro*, así como *in vivo*. Por ejemplo, técnicas *in vitro* para la detección de una proteína de analito incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones, e inmunofluorescencia. Los procedimientos para realizar inmunoensayos se describen, por ejemplo, en "ELISA: Theory and Practice; Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowth (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis y T. C'hristopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; y "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Además, técnicas *in vivo* para la detección de una proteína de analito incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo de proteína anti-analito marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto pueden detectarse mediante técnicas de imagenología estándar.

Los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos de la descripción también son útiles en

una diversidad de formulaciones de diagnóstico y profilácticas. En una realización, se administra un anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico a pacientes que corren el riesgo de desarrollar uno o más de los trastornos mencionados anteriormente. La predisposición de un paciente u órgano a uno o más de los trastornos mencionados anteriormente se puede determinar utilizando marcadores genotípicos, serológicos o bioquímicos.

En otra realización de la descripción, se administra un anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico a individuos humanos diagnosticados con una indicación clínica asociada con uno o más de los trastornos mencionados anteriormente. Tras el diagnóstico, se administra un anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico para mitigar o revertir los efectos de la indicación clínica.

Los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos también son útiles en la detección de una o más dianas en muestras de pacientes y, en consecuencia, son útiles como diagnósticos. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos de la descripción se usan en ensayos *in vitro*, *por ejemplo*, ELISA, para detectar niveles diana en una muestra de paciente.

En una realización, un anticuerpo y/o un anticuerpo activable de la descripción se inmoviliza sobre un soporte sólido (*por ejemplo*, el pocillo o pocillos de una placa de microtitulación). El anticuerpo inmovilizado y/o el anticuerpo activable sirven como un anticuerpo de captura para cualquier diana que pueda estar presente en una muestra de prueba. Antes de poner en contacto el anticuerpo multiespecífico inmovilizado y/o el anticuerpo activable multiespecífico inmovilizado con una muestra del paciente, el soporte sólido se aclara y se trata con un agente bloqueante tal como proteína de leche o albúmina para impedir la adsorción inespecífica del analito.

Posteriormente, los pocillos se tratan con una muestra de prueba sospechosa de contener el antígeno, o con una solución que contiene una cantidad estándar del antígeno. Tal muestra es, *por ejemplo*, una muestra de suero de un sujeto que se sospecha que tiene niveles de antígeno circulante considerados un diagnóstico de una patología. Después de aclarar la muestra de prueba o el estándar, el soporte sólido se trata con un segundo anticuerpo que se marca de manera detectable. El segundo anticuerpo marcado sirve como anticuerpo de detección. Se mide el nivel de marcador detectable, y la concentración de antígeno diana en la muestra de prueba se determina en comparación con una curva estándar desarrollada a partir de las muestras estándar.

Se apreciará que, basándose en los resultados obtenidos usando los anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos de la descripción en un ensayo de diagnóstico *in vitro*, es posible estadificar una enfermedad en un sujeto basándose en los niveles de expresión del antígeno diana. Para una enfermedad dada, se toman muestras de sangre de sujetos diagnosticados en diversas etapas de la progresión de la enfermedad, y/o en diversos puntos del tratamiento terapéutico de la enfermedad. Utilizando una población de muestras que proporciona resultados estadísticamente significativos para cada etapa de progresión o terapia, se designa un intervalo de concentraciones del antígeno que puede considerarse característico de cada estadio.

También pueden usarse anticuerpos multiespecíficos, y/o anticuerpos activables multiespecíficos en procedimientos de diagnóstico y/o imagenología. En algunas realizaciones, dichos procedimientos son procedimientos *in vitro*. En algunas realizaciones, tales procedimientos son procedimientos *in vivo*. En algunas realizaciones, dichos procedimientos son procedimientos *ex vivo*. Por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos, y/o anticuerpos activables multiespecíficos que tienen un CM escindible enzimáticamente pueden usarse para detectar la presencia o ausencia de una enzima que es capaz de escindir el CM. Dichos anticuerpos activables pueden usarse en diagnósticos, que pueden incluir la detección *in vivo* (por ejemplo, cualitativa o cuantitativa) de la actividad enzimática (o, en algunas realizaciones, un entorno de potencial de reducción aumentado tal como el que puede proporcionar la reducción de un enlace disulfuro) a través de la acumulación medida de anticuerpos activados (es decir, anticuerpos resultantes de la escisión de un anticuerpo activable) en una célula o tejido dado de un organismo huésped dado. Tal acumulación de anticuerpos activados indica no solo que el tejido expresa actividad enzimática (o un potencial de reducción aumentado dependiendo de la naturaleza del CM) sino también que el tejido expresa al menos una diana a la que se une el anticuerpo activado.

Por ejemplo, el CM puede seleccionarse como sustrato de proteasa para una proteasa encontrada en el sitio de un tumor, en el sitio de una infección viral o bacteriana en un sitio biológicamente confinado (*por ejemplo*, tal como en un absceso, en un órgano y similares), y similares. Al menos uno de los AB puede ser uno que se une a un antígeno diana. Usando procedimientos familiares para un experto en la técnica, un marcador detectable (*por ejemplo*, un marcador fluorescente o marcador radiactivo o radiotrazador) puede conjugarse con un AB u otra región de un anticuerpo multiespecífico y/o anticuerpo activable multiespecífico. Marcadores detectables adecuados se analizan en el contexto de los procedimientos de cribado anteriores y se proporcionan ejemplos específicos adicionales a continuación. Usando al menos un AB específico para una proteína o péptido del estado de la enfermedad, junto con una proteasa cuya actividad es elevada en el tejido de la enfermedad de interés, los anticuerpos activables exhibirán una mayor tasa de unión al tejido de la enfermedad en relación con los tejidos donde la enzima específica del CM no está presente en un nivel detectable o está presente en un nivel más bajo que en el tejido de la enfermedad o está inactiva (por ejemplo, en forma de zimógeno o en complejo con un inhibidor). Dado que las proteínas pequeñas y los péptidos se eliminan rápidamente de la sangre por el sistema de filtración renal, y dado que la enzima específica para el CM no está presente en un nivel detectable (o está presente en niveles inferiores en tejidos que no son de la

enfermedad o está presente en conformación inactiva), la acumulación de anticuerpos activados en el tejido de la enfermedad aumenta en relación con los tejidos que no son de la enfermedad.

En otro ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos activables pueden usarse para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión en una muestra. Por ejemplo, cuando los anticuerpos activables multiespecíficos contienen un CM susceptible de escisión por una enzima, los anticuerpos activables multiespecíficos pueden usarse para detectar (ya sea cualitativa o cuantitativamente) la presencia de una enzima en la muestra. En otro ejemplo, donde los anticuerpos activables multiespecíficos contienen un CM susceptible de escisión por agente reductor, los anticuerpos activables multiespecíficos pueden usarse para detectar (ya sea cualitativa o cuantitativamente) la presencia de condiciones reductoras en una muestra. Para facilitar el análisis en estos procedimientos, los anticuerpos activables multiespecíficos pueden marcarse de manera detectable y pueden unirse a un soporte (por ejemplo, un soporte sólido, tal como un portaobjetos o una perla). El marcador detectable puede posicionarse en una porción del anticuerpo activable que no se libera después de la escisión, por ejemplo, el marcador detectable puede ser un marcador fluorescente inactivado u otro marcador que no sea detectable hasta que se haya producido la escisión. El ensayo se puede realizar, por ejemplo, poniendo en contacto los anticuerpos activables multiespecíficos inmovilizados, marcados de forma detectable con una muestra que se sospecha que contiene una enzima y/o agente reductor durante un tiempo suficiente para que tenga lugar la escisión, que se lava a continuación para eliminar el exceso de muestra y contaminantes. La presencia o ausencia del agente de escisión (por ejemplo, enzima o agente reductor) en la muestra se evalúa a continuación mediante un cambio en la señal detectable de los anticuerpos activables multiespecíficos antes de entrar en contacto con la muestra, por ejemplo, la presencia y/o un aumento en la señal detectable debido a la escisión del anticuerpo activable multiespecíficos por el agente de escisión en la muestra.

Dichos procedimientos de detección pueden adaptarse para proporcionar también la detección de la presencia o ausencia de una diana que sea capaz de unir al menos un AB de los anticuerpos activables multiespecíficos cuando se escinde. Por lo tanto, los ensayos se pueden adaptar para evaluar la presencia o ausencia de un agente de escisión y la presencia o ausencia de una diana de interés. La presencia o ausencia del agente de escisión puede detectarse por la presencia y/o un aumento en el marcador detectable de los anticuerpos activables multiespecíficos como se ha descrito anteriormente, y la presencia o ausencia de la diana puede detectarse mediante la detección de un complejo diana-AB, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo anti-diana marcado de forma detectable.

Los anticuerpos activables también son útiles en imagenología *in situ* para la validación de la activación de anticuerpos activables, por ejemplo, por escisión de proteasa, y la unión a una diana particular. La imagenología *in situ* es una técnica que permite la localización de la actividad proteolítica y la diana en muestras biológicas tales como cultivos celulares o secciones de tejido. Usando esta técnica, es posible confirmar tanto la unión a una diana dada como la actividad proteolítica basándose en la presencia de un marcador detectable (por ejemplo, un marcador fluorescente).

Estas técnicas son útiles con cualquier célula congelada o tejido derivado de un sitio de enfermedad (por ejemplo, tejido tumoral) o tejidos sanos. Estas técnicas también son útiles con muestras frescas de células o tejidos.

En estas técnicas, un anticuerpo activable se marca con un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un colorante fluorescente (por ejemplo, un fluoróforo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de rodamina (TRITC), un marcador Alexa Fluor®), un colorante de infrarrojo cercano (NIR) (por ejemplo, nanocristales Qdot®), un metal coloidal, un hapteno, un marcador radiactivo, biotina y un reactivo de amplificación tal como estreptavidina, o una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina).

La detección de la etiqueta en una muestra que se ha incubado con el anticuerpo activable multiespecífico etiquetado indica que la muestra contiene la diana y contiene una proteasa que es específica para el CM del anticuerpo activable multiespecífico. En algunas realizaciones, la presencia de la proteasa se puede confirmar usando inhibidores de proteasa de amplio espectro tales como aquellos descritos como heroína, y/o usando un agente que es específico para la proteasa, por ejemplo, un anticuerpo tal como A11, que es específico para la proteasa matriptasa (MT-SP1) e inhibe la actividad proteolítica de MT-SP1; ver, por ejemplo, Publicación internacional Número WO 2010/129609, publicada el 11 de noviembre de 2010. El mismo enfoque del uso de inhibidores de proteasa de amplio espectro tales como los descritos en esta invención, y/o usando un agente inhibidor más selectivo puede usarse para identificar una proteasa o clase de proteasas específicas para el CM del anticuerpo activable. En algunas realizaciones, la presencia de la diana puede confirmarse usando un agente que es específico para la diana o la etiqueta detectable puede competir con la diana no etiquetada. En algunas realizaciones, podría usarse un anticuerpo activable no etiquetado, con detección mediante un anticuerpo secundario etiquetado o un sistema de detección más complejo.

Técnicas similares también son útiles para la imagenología *in vivo* donde la detección de la señal fluorescente en un sujeto, *por ejemplo*, un mamífero, incluido un ser humano, indica que el sitio de la enfermedad contiene la diana y contiene una proteasa que es específica para el CM del anticuerpo activable multiespecífico.

Estas técnicas también son útiles en kits y/o como reactivos para la detección, identificación o caracterización de la actividad de la proteasa en una variedad de células, tejidos y organismos en función del CM específico de proteasa en el anticuerpo activable multiespecífico.

Administración Terapéutica y Formulaciones de Anticuerpos Multiespecíficos y/o Anticuerpos Activables Multiespecíficos

Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas según la descripción se administrará con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan a las formulaciones para proporcionar una mejor transferencia, administración, tolerancia y similares. Una multitud de formulaciones apropiadas se pueden encontrar en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (15ª ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularmente el Capítulo 87 por Blaug. Seymour, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas absorbentes anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias según la presente descripción, siempre que el principio activo en la formulación no sea inactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm, 203(1-2); 1-60 (2000). Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci.89(8):967-78 (2000), Powell y col. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) y las citaciones en los mismos para obtener información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos y/o las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos conjugados se administran junto con uno o más agentes adicionales, o una combinación de agentes adicionales. Agentes adicionales adecuados incluyen terapias farmacéuticas y/o quirúrgicas actuales para una aplicación prevista. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos activables multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos conjugados se pueden utilizar junto con un agente quimioterapéutico o antineoplásico adicional. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos y/o las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos conjugados y el agente adicional se formulan en una única composición terapéutica, y los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos y/o las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos conjugados y el agente adicional se administran simultáneamente. De manera alternativa, los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos y/o las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos conjugados y el agente adicional están separados entre sí, *por ejemplo*, cada uno se formula en una composición terapéutica separada, y los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos y/o las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos conjugados y el agente adicional se administran simultáneamente, o los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos y/o las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos conjugados y el agente adicional se administran en diferentes momentos durante un régimen de tratamiento. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos y/o las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos conjugados se administran antes de la administración del agente adicional, los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos y/o las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos conjugados se administran después de la administración del agente adicional, o los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos y/o las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos conjugados y el agente adicional se administran de forma alterna. Tal como se describe en esta invención, los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos y/o las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos conjugados y el agente adicional se administran en dosis únicas o en dosis múltiples.

En algunas realizaciones, el agente adicional está acoplado o unido de otro modo a los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos y/o las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos conjugados.

Agentes adicionales adecuados se seleccionan según el propósito de la aplicación prevista (*es decir*, destrucción, prevención de la proliferación celular, terapia hormonal o terapia génica). Dichos agentes pueden incluir, pero sin limitarse a, por ejemplo, agentes farmacéuticos, toxinas, fragmentos de toxinas, agentes alquilantes, enzimas, antibióticos, antimetabolitos, agentes antiproliferativos, hormonas, neurotransmisores, ADN, ARN, ARNip, oligonucleótidos, ARN antisentido, aptámeros, diagnósticos, colorantes radiopacos, isótopos radiactivos, compuestos fluorogénicos, etiquetas magnéticas, nanopartículas, compuestos marcadores, lectinas, compuestos que alteran la permeabilidad de la membrana celular, compuestos fotoquímicos, moléculas pequeñas, liposomas, micelas, vectores de terapia génica, vectores virales y similares. Finalmente, se pueden usar combinaciones de agentes o combinaciones de diferentes clases de agentes.

Los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos activables multiespecíficos y/o las composiciones de anticuerpos activables multiespecíficos conjugados de la descripción (también denominados en esta invención "compuestos activos"), y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración. Los principios y consideraciones involucrados en la preparación de dichas composiciones, así como la orientación en la elección de componentes se proporcionan, por ejemplo, en

Remington 's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 19^a ed. (Alfonso R. Gennaro, y col., editores) Mack Pub. Co., Easton, Pa. : 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; y Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

5 Dichas composiciones comprenden típicamente el anticuerpo multiespecífico y/o el anticuerpo activable multiespecífico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Cuando un anticuerpo multiespecífico y/o un anticuerpo activable multiespecífico incluye un fragmento del dominio AB, se puede utilizar el fragmento más pequeño del AB que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región
10 variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que conserven la capacidad del AB de unirse a la secuencia de proteínas diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. (Véase, e.g., Marasco y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)).

15 Como se usa en esta invención, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Vehículos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo. Ejemplos adecuados de dichos vehículos o diluyentes incluyen, pero sin limitarse a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y albúmina sérica humana al 5 %. También se pueden usar liposomas y
20 vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que un medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas.

25 Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Una composición farmacéutica de la descripción se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, *por ejemplo*, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o
30 suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, una solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminetetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tal como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis
35 múltiples de vidrio o plástico.

40 Composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (en los casos donde sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una aplicación con jeringa fácil. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la
45 acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por
50 ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

55 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.
60

65 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las

composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para su uso como enjuague bucal, donde el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se agita y se expectora o se traga. Pueden incluirse como parte de la composición agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, troches y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un

excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, *por ejemplo*, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a penetrar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, bálsamos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación sostenida/controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilén vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de las formulaciones mencionadas anteriormente serán evidentes para los expertos en la materia.

Por ejemplo, los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (para ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, *por ejemplo*, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poli láctidos (Pat. EE. UU. N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse según procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación, como se usa en esta invención, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada dosis unitaria una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la descripción se dicta por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se va a lograr, y de las limitaciones inherentes en la técnica de la formación de compuestos de tal compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para su administración.

La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a tratar, por ejemplo, en algunas realizaciones, aquellas con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente que mejora su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citocina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son efectivos para el fin previsto.

En una realización, los compuestos activos son administrables en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que son útiles para tratar afecciones o trastornos patológicos, tales como trastornos autoinmunitarios y enfermedades inflamatorias. El término "en combinación" en este contexto significa que los agentes se proporcionan de forma sustancialmente simultánea, al mismo tiempo o en secuencia. Si se administra en secuencia, al inicio de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos todavía es detectable a concentraciones efectivas en el sitio de tratamiento.

Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir uno o más anticuerpos de la descripción coformulados con, y/o coadministrados con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más inhibidores de citocinas y factores de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe en más detalle a continuación. Además, uno o más anticuerpos descritos en esta invención se pueden utilizar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos descritos en esta invención. Dichas terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosis más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En otras realizaciones, uno o más anticuerpos de la descripción se pueden coformular con, y/o coadministrar con uno o más fármacos antiinflamatorios, inmunosupresores o inhibidores metabólicos o enzimáticos. Ejemplos no taxativos de los fármacos o inhibidores que se pueden utilizar en combinación con los anticuerpos descritos en esta invención incluyen, pero sin limitarse a, uno o más fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), por ejemplo, ibuprofeno, tenidap, naproxeno, meloxicam, piroxicam, diclofenaco, e indometacina; sulfasalazina; corticosteroides tales como prednisona; fármacos antiinflamatorios supresores de citocinas (CSAID); inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos, por ejemplo, inhibidores de la biosíntesis de purina, antagonistas de folato (*por ejemplo*, metotrexato [N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil] metilamino] benzoil]-L-ácido glutámico); e inhibidores de la biosíntesis de pirimidina, por ejemplo, inhibidores de dihidroorotato dehidrogenasa (DHODH). Agentes terapéuticos adecuados para su uso en combinación con los anticuerpos de la descripción incluyen inhibidores de NSAID, CSAID, (DHODH) (*por ejemplo*, leflunomida) y antagonistas del folato (*por ejemplo*, metotrexato).

Ejemplos de inhibidores adicionales incluyen uno o más de: corticosteroides (oral, inhalada e inyección local); inmunosupresores, *por ejemplo*, ciclosporina, tacrolimus (FK- 506); e inhibidores de mTOR, *por ejemplo*, sirolimus (rapamicina - RAPA-MUNE™ o derivados de rapamicina, *por ejemplo*, derivados de rapamicina solubles (*por ejemplo*, derivados de rapamicina de éster, *por ejemplo*, CCI- 779); agentes que interfieren con la señalización por citocinas proinflamatorias tales como TNF α o IL-1 (*por ejemplo*, IRAK., NIK, IKK. p38 o inhibidores de quinasa MAP); Inhibidores de COX2, *p. ej.*, celecoxib, rofecoxib y variantes de los mismos; inhibidores de fosfodiesterasa, *p. ej.*, R973401 (inhibidor de fosfodiesterasa tipo IV); inhibidores de fosfolipasa, *por ejemplo*, inhibidores de fosfolipasa citosólica 2 (cPLA2) (*por ejemplo*, análogos de trifluorometil cetona); inhibidores del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares o receptor del factor de crecimiento, *por ejemplo*, Inhibidor de VEGF y/o inhibidor de VEGF-R; e inhibidores de la angiogénesis. Agentes terapéuticos adecuados para su uso en combinación con los anticuerpos de la descripción son inmunosupresores, *p. ej.*, ciclosporina, tacrolimus (FK-506); inhibidores de mTOR, *p. ej.*, sirolimus (rapamicina) o derivados de rapamicina, *p. ej.*, derivados de rapamicina solubles (*p. ej.*, derivados de rapamicina de éster, *p. ej.*, CCI-779); inhibidores de COX2, *p. ej.*, celecoxib y variantes de los mismos; y inhibidores de fosfolipasa, *por ejemplo*, inhibidores de fosfolipasa citosólica 2 (cPLA2), *por ejemplo*, análogos de trifluorometil cetona.

Ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que se pueden combinar con un anticuerpo de la divulgación incluyen uno o más de: 6-mercaptapurinas (6-MP); azatioprina sulfasalazina; mesalazina; olsalazina; cloroquina/hidroxiclороquina (PLAQUENIL®); penicilamina; aurotiomalato (intramuscular y oral); azatioprina; colchicina; agonistas de los adrenorreceptores beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeterol); xantinas (teofilina, aminofilina); cromoglicato; nedocromilo; cetotifeno; ipratropio y oxitropio; micofenolato mofetilo; agonistas de adenosina; agentes antitrombóticos; inhibidores del complemento; y agentes adrenérgicos.

EJEMPLOS

Las siguientes secuencias mostradas en la Tabla 7 incluyen secuencias que se utilizaron a lo largo de los Ejemplos proporcionados en esta invención:

Tabla 7: Ejemplos de secuencias

Anticuerpo CTLA-4 scFv anti-humano:

GGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAG
 GCGGAGGTGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
 AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAG
 CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCA
 TCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACT
 GGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCTCACTTTC
 GGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTTCCGGAGGGTCGACCATAACTTCGTATAATG
 TATACTATACGAAGTTATCCTCGAGCGGTACCCAGGTGCAGCTGGTGCAGACTGGGGGAGG
 CGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCTTTAGC
 AGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTA
 TTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC
 CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAGC
 GCCGTATATTACTGTGCGACAACTCCCTTTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCA
 CCCTGGTCACTGTCTCTTCAGCTAGC (SEQ ID NO: 229)

GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGSGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ
 QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQSSPLTF
 GGGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQTGGGVVQPGRLRLSCAASGSTFS
 SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADT
 AVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (SEQ ID NO: 230)

Anticuerpo CD3 épsilon OKT3 scFv anti-humano;

GGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAG
 GCGGAGGTGAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGT
 TAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAA
 CAGCGTCCGGGTGAGGCTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCA
 ACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCTTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCAGC
 CTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCAGCTAT
 TATGATGATCACTATTGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCTGACCGTTAGCAGCG
 GTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTCTGACCCA
 GAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGC
 AGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACGTTGGA
 TTTATGATACCAGCAAACTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGG
 CACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGT
 CAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAATCGT
 (SEQ ID NO: 231)

GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVK
 QRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARY
 YDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGQIVLTQSPAISASPGKVTMTCSAS
 SSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYC
 QQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 232)

Anticuerpo Jagged 4D11v2 Anti-humano: Cadena pesada

gaggtgcacctgttgaggtctgggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactct
 cctgtgcagcctctggattcaccttttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctcc
 agggaaggggctggagtggtgtcaagtattgacccggaaggtcggcagacatattacgca
 gactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgc
 aatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagacatcggcgg
 caggctcggcctttgactactggggccagggaaccctgggtcacctctctcagctagcacc
 aagggcccacatcgggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcgg
 ccctgggtgctgttggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcagg
 cgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccggtgtcctacagtctcaggaactctactcc
 ctgagcagcgtggtgacgtgacctccagcagcttgggacccagacctacatctgcaacg
 tgaatcacaaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtgaaa
 aactcacacatgcccacgtgcccagcacctgaaactcctggggggaccgtcagttctctc
 tccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctgtg
 tgggtgagcgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtc
 agcgtcctcacgtcctgcaccaggaactggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggctct
 ccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccg
 agaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgaggaggagatgaccaagaaccaggtcagc
 ctgacctgctggtcaaaggttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
 ggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctt
 cctctacagcaagctcacgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
 tccgtgatgcatgaggtctctgcacaacctacacgcagaagagcctctccctgtctccgg
 gtaaa (SEQ ID NO:233)

EVHLLSGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYYA
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLLVTVSSAST
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:234)

Anticuerpo Jagged 4D11v2 anti-humano: Cadena ligera

Gacatccagatgacccaggtctccatccctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacca
 tcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattgggtatcagcagaaaccagg
 gaaagcccttaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaaagtggggteccatcaagg
 ttcagtgccagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaag
 attttgcaacttactactgtcaacagacgggtgtggcgccctccgttattcggccaaggac
 caaggtggaaatcaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgat
 gagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgtgaataacttctatcccagag
 agggcaaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggttaactcccaggagagtg
 cacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgancaaa
 gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgogaagtccccatcagggcctgagctcgc
 ccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtg (SEQ ID NO: 235)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTIVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLLXK
 ADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 236)

Anticuerpo: Jagged 4D11Anti-humano: Cadena pesada

gaggtgcagctgttgaggtctgggggagggcttggtacagcctggggggtccctgagactct
 cctgtgcagcctctggattcacctttagcagctatgccatgagctgggtccggccaggctcc
 agggaaaggggctggagtggtgtcaagtattgacccggaaggtcggcagacatattacgca
 gactccgtgaagggccgggttcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgc
 aatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagacatcggcgg
 caggtcggcctttgactactggggccagggaaccctgggtcaccgtctcctcagctagcacc
 aagggcccatcggtcttccccctggcacccctcctccaagagcacctctgggggacagcgg
 ccctgggtgcctgggtcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcagg
 cgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactcc
 ctgagcagcgtggtgacgtgcctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacg
 tgaatcacaaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccacgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctcctc

ttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaaccctgaggtcacatgcgtgg
tggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
ggtgcataatgccaaagacaaagccgcgaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtc
agcgtctcaccgtcctgcaccaggactggtgaatggcaaggagtacaagtgcagggtct
ccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg
agaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
ggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccggtggtgactccgacggctccttctt
cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
tccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgg
gtaaa (SEQ ID NO: 237)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYIA
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 238)

Anticuerpo Activable Anti-Jagged 5342-1204-4D11v2: Cadena ligera

caaggccagtctggccagtgcataatattggtcgtaggtggtgattgcaggggctggcagg
ggggctcgagcgggtggcagcgggtggtctggtggtctgagcggcgggtccgataatcatgg
cggcgggtctgacatccagatgacccaggtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagac
agagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcagc
agaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaaagtggggt
cccatcaagggttcagtggtggtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctctg
caacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagacgggttggtggcgcctccgttattcg
gccaaagggaaccaaggtggaatcaaacgtacgggtggtgcaccatctgtcttcatcttccc
gccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaataacttc
tatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactccc
aggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgac
gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc
ctgagctcgccgtcacaagagcttcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 239)

QQQSGQCNIWLVGDCRGWQGGSSGGSGGSGGLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD
RVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCQQTIVVAPPLFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNPF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLLKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 240)

Anticuerpo Multiespecífico Anti-Jagged 4D11v2 - anti-CD3 OKT3: Cadena pesada

GAGGTGCACCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCC
 AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAAGTATTGACCCGGAAGGTCGGCAGACATATTACGCA
 GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC
 AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGACATCGGCGG
 CAGGTCCGCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACC
 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
 CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGG
 CGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
 TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
 TCCCCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCCTGCTGCACACGAGTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
 CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAAGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGG
 TTAAACAGCGTCCGGGTGAGGCTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTA
 TACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGC
 ACCGCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCAC
 GCTATTATGATGATCACTATTGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCAACCTGACCGTTAG
 CAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTG
 ACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCG
 CCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACG
 TTGGATTTATGATACCAGCAAACTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGT
 AGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAAGTGCAGCAACCTATT
 ATTGTACAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAA
 TCGT (SEQ ID NO: 241)

EVHLLSEGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRTYYA
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSSAST
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGGSGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGA
 SVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSS
 TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGQIVL
 TQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAPHRGSG
 SGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 242)

Anticuerpo anti-Jagged 4D11v2 - anti-CD3 OKT3: Cadena ligera

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA
 TCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG
 GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCGGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGG
 TTCAGTGGCAGTGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG
 ATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGACGGTTGTGGCGCCTCCGTTATTCGCCCAAGGGAC
 CAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGANCAAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTCAAG
 CTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTCAGGTTCAAGCTGCAGCAGAGC
 GGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGTTATA
 CCTTTACCGGTTATACCATGCATTGGGTAAACAGCGTCCGGGTCAAGGTCTGGAATGGAT
 TGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCA
 ACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCGCCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAG
 AGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATCACTATTGCCTGGATTATTG
 GGGTCAGGGCACCACCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCA
 GCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGG
 GTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCA
 GCAGAAAAGCGGCACCAGCCCCGAAACGTTGGATTTATGATACCAGCAAACTGGCAAGCGGT
 GTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTA
 TGGGAAGCAGAAGTGCAGCAACCTATTATTGTGACAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTT
 TGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAATCGT (SEQ ID NO: 243)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQTIVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTIXK
 ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGQVQLQQS
 GAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA
 TLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGS
 GGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKLASG
 VPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID
 NO: 244)

Anticuerpo activable multiespecífico anti-Jagged-anti-CD3 5342 - 1204-4D11v2—CD3 OKT3: Cadena ligera

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCAATATTTGGCTCGTAGGTGGTGATTGCAGGGGCTGGCAGG
 GGGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTCCGATAATCATGG
 CGGCGGTCTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
 AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGC
 AGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCGGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGT
 CCCATCAAGSTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTG
 CAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGACGGTTGTGGCGCCTCCGTTATTGG
 GCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
 GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC
 AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC
 GCTGANCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
 CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTG
 GCGGTTTCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGCGGAGGTGAGGTTGAGCT
 GCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAATGAGCTGTAAAGCA
 AGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCCGGGTGAGGTC
 TGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAACCAGAAATTCAA
 AGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCGCCTATATGCAGCTGAGCAGC
 CTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATCACTATTGCC
 TGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTAGTGGTGG
 CGGTGGTTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGC
 GCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGA
 ATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCGAAACGTTGGATTATGATACCAGCAAATCT
 GGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACC
 ATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATC
 CGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAATCGT (SEQ ID NO: 245)

QQSGGQCNIWLVGDCRGWQGGSSGGSGGSLGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLASVGD
 RVTITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGGSGTDFTLTISSL
 QPEDFATYYCQQTVVAPPLEGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
 YPBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSLSSLTLTLXKADYEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGECGGGSGGGGSGSGGGSGGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKA
 SGYTFTRYTMHWVKQRPQGGLWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSS
 LTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSIIVLTQSPAIMS
 ASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKIASGVPAPHFRGSGSGTSYSLT
 ISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 246)

Anticuerpo Multiespecífico Anti-Jagged 4D11v2-anti-CTLA-4: Cadena Pesada

GAGGTGCACCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT
CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCC
AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAAGTATTGACCCGGAAGGTGCGGCAGACATATTACGCA
GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGACATCGGCGG
CAGGTGCGGCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCTTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCAC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGG
CGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCTTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCTTCACCGTCTTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAAGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGG
ATCAGGCGGAGGTGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGG
GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT
ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCAC
TGGCATCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
AGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCA
CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTTCCGGAGGGTCCACCATAAATTTCGTA
TAATGTATACTATACGAAGTTATCCTCGAGCGGTACCCAGGTGCAGCTGGTGCAGACTGGG
GGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCT

GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC
AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAC
GCTGANCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTG
GCGGTTTCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTGAAATTGTGTT
GACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC
CCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAAGTG
CAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA
GTGTATTACTGTGAGCAGTATGGTAGCTCACCCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG
AAATCAAACGTTCCGGAGGGTCCGACCATACTTCGTATAATGTATACTATACGAAGTTATC
CTCGAGCGGTACCCAGGTGCAGCTGGTGCAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGG
TCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAG
CACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAAC
ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGA
CAAACTCCCTTTACTGGTACTTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCTTC
AGCTAGC (SEQ ID NO: 251)

QQSGQCNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSGGSLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGD
RVTITCRASQSISSYLWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQTIVVAPFLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLLKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGECGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCR
ASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA
VYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQTGGGVVQPR
SLRLSCAASGSTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKN
TLYLQMNSLRLEDTAIVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (SEQ ID NO: 252)

Anti-EGFR :c225v5 : Cadena Pesada de Anticuerpos

caggtgcagctgaaacagagcgccccgggcctggtgcagccgagccagagcctgagcatta
cctgcaccgtgagcggccttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcgccagagccc
gggcaaaggcctggaatggctgggcgtgatttgagcgcgccgaacaccgattataacacc

ccgtttaccagccgcctgagcattaacaaaagataacagcaaaagccaggtgttttttaaaa
 tgaacagcctgcaaagccaggataaccgcgatttattattgcgcgcgcgcgctgacctatta
 tgattatgaatttgctattggggccagggcaccctgggtgaccgtgagcgcggttagcacc
 aagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgg
 ccttgggtgctgctggtaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcagg
 cgcctgaccagcggcgtgcacacettccccgggtgtcctacagtcctcaggactctactcc
 ctgagcagcgtgggtgaccgtgccttccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacg
 tgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaagttagcccaaattcttgtagaaa
 aactcacacatgcccacgtgcccagcacctgaactcctgggggggacgtcagtcctcctc
 tccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaacctctgaggtcacatgctgtg
 tgggtgacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtc
 agcgtcctcacgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtct
 ccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg
 agaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggatgaactgaccaagaaccaggtcagc
 ctgacctgctggtcaaaggttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
 ggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctccttctt
 cctctacagcaagctcacgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
 tccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacaacgcagaagagcctctccctgtctccg
 gtaaatga (SEQ ID NO: 253)

QVQLKQSGPGLVPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNT
 PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAAST
 KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 254)

Anticuerpo anti-EGFR C225v5: Cadena Ligera

CAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCT
 TTAGCTGCCGCGGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAA
 CGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGC

TTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAAGCGAAG
ATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCAC
CAAACCTGGAACGTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
GAGCAGTTGAAATCTGGAACGTGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
AGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGT
CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA
GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 255)

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSR
FSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNFPYPREARVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 256)

Anticuerpo Anti-EGFR C225v5: Cadena pesada

caggtgcagctgaaacagagcggcccgggcctggtgcagccgagccagagcctgagcatta
cctgcaccgtgagcggccttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcgcccagagccc
gggcaaaggcctggaatggctggcggtgatgtggagcggcggaacaccgattataacacc
ccgtttaccagccgctgagcattaacaaagataaacagcaaaagccaggtgttttttaaaa
tgaacagcctgcaaagcaacgataccgcgatttattatttgcgcgcgcgcgctgacctatta
tgattatgaatttgcgtattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcgcggttagcacc
aaggggcccatcggctcttccccctggcacccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgg
ccctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtggaactcagg
cgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc
ctcagcagcgtggtgaccgtgcccctcagcagcttgggcaaccagacctacatctgcaacg
tgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagcgcgttgagcccaatcttgtgacaa
aactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagctcttccctc
ttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaaccctgaggtcacatgcgtgg
tggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
ggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtc
agcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggtct
ccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg
agaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccggtatgaactgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
ggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctccttctt
cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
tccgtgatgcagaggtctctgcacaaccactacaagcagaagagcctctccctgtctccgg
gtaaa (SEQ ID NO: 257)

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 258)

Anticuerpo Anti-EGFR C225v5: Cadena ligera

Ggcggtacccagatcttgctgaccagagcccggtgattctgagcgtgagcccgggcggaacgtgtgagctttagctgccgcgcgagccagagcattggcaccacattcattgggtatcagcagcgccaccaaagcgagcccgcgctgctgattaaatatgcgagcgaaagcattagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcggaagatattgctgattattattgccagcagaacaacaactggccgaccacctttggcgcgggcaccacaaactggaactgaaacgtacggtggtgacccatctgtcttcattctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtgggaagggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggccctgagctcgcccgctcacaagagcttcaacagggggagcg (SEQ ID NO: 259)

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNMWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 260)

Anticuerpo Anti-EGFR C225v4: Cadena pesada

cagggtgcagctgaaacagagcggcccgccggtggtgcagccgagccagagcctgagcatta
 cctgcaccgtgagcggccttttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcgcccagagccc
 gggcaaaaggcctggaatggctggcggtgat ttggagcggcggcaacaccgattataacacc
 ccgtttaccagccgcctgagcattaacaaaagataaacagcaaaagccaggtgttttttaaaa
 tgaacagcctgcaaagcaacgataccgcgattttattattgcgcgcgcgctgacctatta
 tgattatgaattttgctatttggggccagggcaccctggtgaccgtgagcgcggtagcacc
 aagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgg
 cctggtgctgctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaaactcagg
 cgccctgaccagcggcgtgacacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc
 ctgagcagcgtggtgaccgtgcccctcagcagccttgggcacccagacctacatctgcaacg
 tgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagagcccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccacgctgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtccttctc
 ttccccccaaaaccgaagacacctcatgatctcccggaaccttgaggtcacatgcgtgg
 tgggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagt tcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtc
 agcgtcctcacgctcctgcaccaggactggtgaatggcaaggagtacaagtgcagggtct
 ccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg
 agaaccacaggtgtacaccttgcccccatcccggtatgaactgaccaagaaccagggtcagc
 ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
 ggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctccttctt
 cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
 tccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaacgcagaagagcctctccctgtctccgg
 gtaaatga (SEQ ID NO: 261)

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYN
 PFTSRLSINKDNSKQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAAST
 KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 262)

Anticuerpo Anti-EGFR C225v4: Cadena Ligera

Cagatcttgetgacccagagcccggtgattctgagcgtgagccggcggaacgtgtgagct
 ttagctgccgcgcgagccagagcattggcaccacattcattgggtatcagcagcgcaccaa
 cggcagcccgccgctgctgattaaatagcgagcgaaagcattagcggcattccgagccgc
 tttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaag
 atattgaggattattattgcccagcagaacaacaactggccgaccacctttggcgccgggac
 caaactggaactgaaacgtacgggtggtgacccatctgtcttcatcttcccgccatctgat
 gagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgectgctgaataacttctatccagag
 aggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggttaactccaggagagtg
 cacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaa
 gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgogaagtcacccatcaggccctgagctgc
 ccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgtag (SEQ ID NO: 263)

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKYASESISGIPSR
 FSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK
 ADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 264)

Anticuerpo Anti-EGFR C225v6: Cadena pesada

cagggtgcagctgaaacagagcggcccgccggtgagccgagccagagcctgagcatta
 cctgcaccgtgagcggcttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcccagagccc
 gggcaaaggcctggaatggctggcgctgatttgagcggcggaacaccgattataacacc
 ccgtttaccagccgctgagcattaacaaagataaacagcaaaagccaggtgttttttaaaa
 tgaacagcctgcaaagccaggataccgcgatttattattgcgcgcgcgctgacctatta
 tgattatgaatttgctattggggccagggcacccctggtgaccgtgagcgcggctagcacc
 aagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgg
 ccctgggtgctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcagg
 cgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc
 ctgagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacg
 tgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctcttctc
 ttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaaccctgaggtcacatgcgtgg
 tgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtga
 ggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtagccagcacgtaccgtgtggtc

agcgtcctcacgcgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcagggtct
ccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg
agaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccggtatgaactgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgcctgggtcaaaggcttctatccagcgcacatcgccgtggagtgggagagcaatg
ggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgaaggctccttctt
cctctacagcaagctcacgcgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
tccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacaacgcagaagagcctctccctgtctccgg
gtaaatga (SEQ ID NO: 265)

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNT
PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIIYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 266)

Anticuerpo .Anti-EGFR C225v6: Cadena ligera

Cagatcttgcgtgacccagagcccggtgattctgagcgtgagcccgggcgaaagctgtgagct
ttagctgccgcgcgagccagagcattggcaaccaattcattggtatcagcagcgcaccaa
cggcagcccgcgctgctgattaaatgctgcgagcgaaagcattagcggcattccgagccgc
tttagcggcgcgagcgcgcgcacccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaag
atattgcggattattattgcccagcagaacaacaactggccgaccacdtttggcgcgggcac
caactggaaactgaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgat
gagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagag
aggccaaagtacagtggaggtggataacgcctccaatcgggtaactccagagagagtgt
cacagagcaggacagcaaggacagcacctaagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaa
gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgc
ccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEQ ID NO: 267)

QILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSR
FSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 268)

Anticuerpo activable anti-EGFR 3954-1204-C225v5: Cadena Ligera:

- 10 [Espaciador (SEQ ID NO: 283)][Máscara (SEQ ID NO: 284)]/[Enlazador 1 (SEQ ID NO: 285)][1204 Sustrato (SEQ ID NO: 286)]j [XADNer 2 (SEQ ID NO: 287)][C225v5 cadena ligera (SEQ ID NO: 255)]j

[caagggccagtcttgccag][tgcattctcaacctcggtggttgcgcggacggcccatatcggtca
tgtacggctcgagcgggtggcagcgggtggctctggtggatccgggt][ctgagcggccgttcc
gataatcat][ggcagtagcgggtacc][cagatcttgctgaaccagagcccggtgattctg
agcgtgagcccgggcgaacgtgtgagcttttagctgcccgcgcgagccagagcattggcacca
acattcatttggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgccgctgctgattaaatatgcgag
cgaaagcatttagcggcattccgagccgcttttagcggcagcggcagcggcaccgattttacc
ctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggtattattattgccagcagaacaaca
actggccgaccacctttggcgcgggcaccaaactggaactgaaacgtacgggtggctgcacc
atctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtg
tgctgtctgaataacttetatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataacgccc
tccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacag
cctcagcagcaccctgacgtgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgc
gaagtcacccattcagggcctgagctcgcccgctcacaagagcttcaacaggggagagtgtt
ag] (SEQ ID NO: 269)

[Espaciador (SEQ ID NO: 46)] [Máscara (SEQ ID NO: 77)] [Enlazador 1 (SEQ ID NO: 288)] [1204;Sustrato (SEQ ID NO: 26)] [Xiafer .2 (SEQ ID NO: 289)] [C225v5 (SEQ ID NO: 256)]

[QGQSGQ][CISPRGCPDGPYVMY][GSSGGSGGSGGSG][LSGRSDNH][GSSGT][QIL
LTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLISINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*] (SEQ ID NO: 270)

Anticuerpo multiespecífico anti-EGFR C225v5 - Anti—CD3 OKT3: Cadena pesada

CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATT
CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCC
GGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTGGAGCGGCGGCAACACCGATTATAACACC
CCGTTTACCAGCCGCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAA
TGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATTA
TGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
CCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCAGG
CGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCTTCAGGACTCTACTCC

CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACG
TGAATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCAAAACCAAGGACACCTTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT
CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAACTGACCAAGAACCAGGTACAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAAGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAAGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGG
ATCAGGCGGAGGTGAGGTTTCAAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCA
AGCGTTAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTTACCCGTTATACCATGCATTGGG
TTAAACAGCGTCCGGGTGAGGCTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTA
TACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGC
ACCGCCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCAC
GCTATTATGATGATCACTATTGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCTGACCGTTAG
CAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTTCAAGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTG
ACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCG
CCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACG
TTGGATTTATGATACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGT
AGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATT
ATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAA
TCGT (SEQ ID NO: 271)

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNT
PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPEVLDSDGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGA
SVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSS
TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSGQIVL
TQSPAISASPFGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAAHFRGSG
SGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 272)

CAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCT
 TTAGCTGCCGCGGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAA
 CGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGC
 TTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAGCGAAG
 ATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCAC
 CAACTGGAACGTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGGAACGTGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGG
 CTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTGAGGTTGAGCTGCAGCAGAGC
 GGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATA
 CCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCCGGGTGAGGGTCTGGAATGGAT
 TGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCA
 ACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCGCCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAG
 AGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATCACTATTGCCTGGATTATTG
 GGGTCAGGGCACCACCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCA
 GCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGSCAATTATGAGCGCAAGTCCGG
 GTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCA
 GCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACGTTGGATTATGATAACCAGCAAACTGGCAAGCGGT
 GTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTA
 TGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTT
 TGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAATCGT (SEQ ID NO: 273)

QILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSR
 FSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSK
 ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGQVQLQQS
 GAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKA
 TLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGS
 GGGGSQIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASG
 VPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID
 NO: 274)

Anticuerpo activable multiespecífico Anti-EGFR - anti-CD3 3954-1204-C225v5-OKT3: Cadena ligera

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCATCTCACCTCGTGGTTGTCCGGACGGCCCATACGTCATGT
 ACGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGATCCGGTCTGAGCGGCCGTTCCGATAA
 TCATGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGC
 CCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTTCATT
 GGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCAT
 TAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATT
 AACAGCGTGGAAGCGAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACTGGCCGA
 CCACCTTTGGCGCGGGCACCAAACTGGAAGTGAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT
 CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG
 AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
 GTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG
 CACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC
 CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGAT
 CTGGAGGTGGCGGTTTCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTCA
 GGTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCAGTCCGGTCCAAGCGTTAAATGAGC
 TGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTAAACAGCGTCCGG
 GTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAACCA
 GAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCGCCTATATGCAG
 CTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATC
 ACTATTGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCAACCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTGG
 TAGTGGTGGCGGTGGTTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCA
 ATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTA
 GCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCCGAAACGTTGGATTATGATAC
 CAGCAAAGTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATAT
 AGCCTGACCATTAGCGSTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGT
 CAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAATCGT (SEQ ID
 NO: 275)

QQSGQCISPRGCPDPYVMYGSSGGSGSGSGL5GRSDNHGSSGTQILLTQSPVILSVS
 PGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSI
 NSVESEDIADYYCQQNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGSGSGGSGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMS
 CKASGYTFTRYTMHWVKQRPGGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQ
 LSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGQIVLTQSPA
 IMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRNIYDTSKLASGVPAPHFRGSGSGTSY
 SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 276)

Anticuerpo multiespecífico anti-EGFR C225v5---ADti--CTLA-4; cadena pesada

CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCCGGGCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATT
 CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCAATGGGTGCGCCAGAGCCC
 GGGCAAAGGCCGTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACCCGATTATAACACC
 CCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAA
 TGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATTA
 TGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACC
 AAGGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGG
 CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGG
 CGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
 TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
 TTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
 CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAACTGACCAAGAACCAGGTACAG
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 GGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAAGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAAGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGG
 ATCAGGCGGAGGTGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGG
 GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT
 ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCAC
 TGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
 AGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCA
 CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTTCCGGAGGGTCGACCATAACTTCGTA
 TAATGTATACTATACGAAGTTATCCTCGAGCGGTACCCAGGTGCAGCTGGTGCAGACTGGG
 GGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCT
 TTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
 AGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTTACC
 ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
 ACACGGCCGTATATTACTGTGCGACAAACTCCCTTTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCG
 TGGCACCCCTGGTCACTGTCTCTTCAGCTAGC (SEQ ID NO: 277)

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNT
 PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIIYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAAST

KGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSPDI AVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SYMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGKGGSGGGGSGSGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSSLPG
ERATLSCRASQSVSESYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFGSGSGSGTDFTLTIS
RLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTGQVQLVQTG
GGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYIQMNSLR AEDTAVYYCATN SLYWFYFDLWGRTLVTVSSAS (SEQ ID
NO: 278)

Anticuerpo multiespecífico anti-EGFR C225v5~Anti~CTLA-4: Cadena ligera:

CAGATCTTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCT
TTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCAATTGGTATCAGCAGCGCACCAA
CGGCAGCCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCAATTCCGAGCCGC
TTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAAGCGAA
ATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACACAACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCAC
CAAACTGGAAC TGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTTCCCGCCATCTGAT
GAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCCTCTGTTGTGTGCCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA
GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTCAGG
CTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTGAAATTGTGTTGACACAGTCT
CCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA
GTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGC'TCCCAGGCTCCT
CATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCT
GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACT
GTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACG
TTCCGAGGGTCGACCATAACTTCGTATAA TGTATACTATACGAAGTTATCCTCGAGCGGT
ACCCAGGTGCAGCTGGTGCAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGAC
TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCTTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC

GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAG
 GTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGA
 CCAAGGTGGAAATCAAACGTTCCGGAGGGTTCGACCATAACTTCGTATAATGTATACTATAC
 GAAGTTATCCTCGAGCGGTACCCAGGTGCAGCTGGTGCAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAG
 CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCTTTAGCAGCTATGCCA
 TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAG
 TGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTTACCATCTCCAGAGACAAT
 TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATT
 ACTGTGCGACAACTCCCTTTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCAC
 TGTCTCTTCAGCTAGC (SEQ ID NO: 281)

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYSSGGSGSGSGSLSGRSDNHGSSGTQILLTQSPVILSVS
 PGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLISI
 NSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGSGSGSGSGSGSGGGEIVLTQSPGTLSSLSPGERATL
 SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE
 DFAVYYCQQYGSPLTFGGGKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQVGGGVVQ
 PGRSLRLSCAASGSTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLTVTVSSAS (SEQ ID NO:
 282)

EJEMPLO 1: Preparación de anticuerpos multiespecíficos

- 5 Este Ejemplo demuestra la construcción, expresión y purificación de anticuerpos multiespecíficos anti-Jagged - CD3, anti-Jagged - CTLA-4, anti-EGFR - CD3 y anti-EGFR - CTLA-4.

10 Los vectores se utilizaron para expresar la cadena pesada anti-Jagged (4D11v2), la cadena ligera 5342-1204-4D11v2, la cadena pesada anti-EGFR C225v5, y las secuencias de cadena ligera 3954-1204- C225v5 que se muestran anteriormente. Dichos vectores se describen en las solicitudes pendientes de tramitación WO2013/163631, depositada el 26 de abril de 2013 (titulada "Activatable Antibodies That Bind Epidermal Growth Factor Receptor And Methods Of Use Thereof") y WO2013/192550, depositada el 21 de junio de 2013 (titulada Anti-Jagged Antibodies, Activatable Anti-Jagged Antibodies and Methods of Use Thereof).

- 15 Los vectores se digirieron con las enzimas de restricción NheI y NotI y el fragmento de vector aislado por electroforesis en gel. Los reactivos se prepararon de la siguiente manera: Fragmento CH2CH3 de IgG humana se amplificó en la reacción 1, a partir de Pop Hygro 4D11v2 usando cebador HCFORNhe (Tabla 8, SEQ ID NO: 3) y cebador HCFOROL (Tabla 8, SEQ ID NO: 4), se amplificó CTLA-4 scFv en la reacción 2, a partir del ADNc de CTLA-4 scFv (SEQ ID NO: 229) usando cebador CTRRevNot (Tabla 8, SEQ ID NO: 1) y cebador CTFOROL (Tabla 8, SEQ ID NO: 2), se amplificó OKT3 scFv en la reacción 3, a partir del ADNc de OKT3 scFv (SEQ ID NO: 231) usando el cebador OKRevNot (Tabla 8, SEQ ID NO: 5) y cebador CTFOROL (Tabla 8, SEQ ID NO: 2). Se prepararon fusiones de scFv de IgG humana, CH2CH3/CTLA-4 combinando 10 % de la reacción 1, 10 % de la reacción 2, y amplificando con cebadores, HCFORNhe y CTRRevNot.

25

Tabla 8. Secuencia del cebador

Cebador	Secuencia de ácidos nucleicos	SEQ ID NO

CTRevNot	TCGAGCGGCCGCTCAACTAGCTGAAGAGACAGTG	SEQ ID NO: 1
CTForOL	GCCCTCTAGACTCGATCTAGCTAGCTGAAGAGAC AGTGACCAGG	SEQ ID NO: 2
HCFORNhe	CTCAGCTAGCACCCAGGGCCCATCGGTC	SEQ ID NO: 3
HCRVOL	CTTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTGC	SEQ ID NO: 4
OKRevNot	CTCGAGCGGCCGCTCAACGATTAATTTCCAGTTTG	SEQ ID NO: 5

Después de la amplificación, el ADN resultante se digirió con las enzimas de restricción NheI y NotI y el ADN de fusión CH2CH3/CTLA-4 scFv aislado por electroforesis en gel. Se prepararon fusiones de scFv de IgG humana, CH2CH3/OKT3 combinando 10 % de la reacción 1, 10 % de la reacción 3, y amplificando con cebadores, HCFORNhe y CTRevNot. Después de la amplificación, el ADN resultante se digirió con enzimas de restricción NheI y NotI y el ADN de fusión CH2CH3/CTLA-4 scFv aislado por electroforesis en gel.

Para insertar los fragmentos CH2CH3/scFv en los vectores de expresión, las siguientes combinaciones mostradas en la Tabla 9 se ligaron durante la noche con T4 ADN Ligasa (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA). Después de la ligadura, el ADN se transformó en cepa *E. coli* MC106 y seleccionado para resistencia a la ampicilina. La secuenciación de ADN identificó clones que contenían insertos de ADN que codificaban los anticuerpos multispecíficos correctos o anticuerpos activables multispecíficos, y el ADN se preparó para la transfección de célula de mamífero.

Tabla 9: Reacciones de ligadura

Cadena pesada 1 µl Nhe/NotI digerida anti-Jagged (4D11 v2)	10 µl Nhe/NotI de IgG humana digerida, ADN de fusión CH2CH3/CTLA scFv
1 µl Nhe/NotI digerido anti .lagged (4D11v2) cadena pesada	10 µl Nhe/NotI IgG humana digerida. ADN de fusión CH2CH3/OKT3 scFv
1 µl Nhe/NotI digerido 5342-1204-4D11v2 cadena pesada	10 µl Nhe/NotI digerido IgG humana. ADN de fusión CH2CH3/CTLA scFv
1 µl Nhe/NotI digerido 5342-1204-4D11v2 cadena pesada	IgG humana digerida Nhe/NotI de 10 µl, ADN de fusión CH2CH3/OKT3 scFv
cadena pesada anti-EGFR digerida 1 µl Nhe/NotI (C225v5)	10 µl Nhe/NotI IgG humana digerida. ADN de fusión CH2CH3/CTLA scFv
1 µl Nhe/NotI digerido anti-EGFR. Cadena pesada (C225v5)	10 µl Nhe/NotI IgG humana digerida. ADN de fusión CH2CH3/OKT3 scFv
1 µl Nhe/NotI digerido 3954-1204-C225v5	10 µl Nhe/NotI IgG humana digerida, ADN de fusión CH2CH3/CTLA scFv
1 µl Nhe/NotI digerido 3954-1204-C225v5	10 µl Nhe/NotI IgG humana digerida. ADN de fusión CH2CH3/OKT3 scFv

EJEMPLO 2: Producción de anticuerpos multispecíficos y anticuerpos activables multispecíficos

Las IgG completamente humanas se expresaron a partir de células HEK-293 transfectadas transitoriamente. La cotransfección con vectores de expresión de cadena pesada y cadena ligera distintos, mostrados en la Tabla 10, permitió la expresión de anticuerpos activables multispecíficos.

Tabla 10

Transfección número	Variaciones de la cadena ligera	Vector de cadena pesada
1	anti-EGFR C225v5 LC	C225v5 -OKT3 HC
2	3954-1204-C225v5 LC	C22ε5v5-OKT3 HC
3	C225v5 LC	C225v5-CTLA HC
4	3954-1204-C225v5 LC	C22Sv5-CTLA HC
5	anti-Jagged 4D11v2 LC	4D11v2-OKT3 HC
6	5342-1204-4D11v2 LC	4D11v2-OKT3 HC
7	4D11v2LC	4D11v2-CTLA HC
8	5342-1204-4D11v2 LC	4D11v2-CTLA HC

anticuerpos multispecíficos y los anticuerpos activables multispecíficos expresados en las células HEK-293 se purificaron mediante cromatografía de proteína A.

Ensayos de unión: Como se muestra en la figura 11, los experimentos de unión a ELISA revelaron que los anticuerpos multispecíficos CTLA-4 anti-Jagged y OKT3 anti-Jagged y anticuerpos activables multispecíficos unidos a Jagged 1 humano, y anticuerpos multispecíficos anti-EGFR-CTLA-4 y anti-EGFR-OKT3 y anticuerpos activables multispecíficos se unen específicamente a EGFR humano.

Jagged 1 -Fc humano (R&D Systems; C en # 1277-JG-050) y EGFR humana (R&D Systems, Cat # 344-ER-050) se adsorbieron a diferentes pocillos de una placa ELISA de 96 pocillos. Se aplicaron anticuerpos anti-CTLA y anti-OKT3 anti-EGFR-CTLA o anti-EGFR -OKT3 purificados a la placa y se dejó que se unieran. El anticuerpo unido se visualizó con un conjugado IgG-HRP antihumano (Fab specific, Sigma, St Louis, MO; Cat v A0293-1ML) y se desarrolló con el sustrato cromogénico TMB.

Como se muestra en las Figuras 12A e 12B, los experimentos de unión a ELISA revelaron que el anti-CTLA-4 Jagged y anti-EGFR-CTLA-4 se unen específicamente tanto a CTLA-4 humano como de ratón (el anticuerpo anti CTLA-4 humano A-4 reacciona de forma cruzada con CTLA-4 humano y de ratón): Ya sea CTLA-4 humano (R&D Systems; Car # 325-CT-200/CF o CTLA-4 de ratón (R&D Systems, Cat # 434-CT-20D/CF) se adsorbieron a los pocillos de placas separadas de ELISA de 96 pocillos. Anticuerpo activable anti-Jagged 4D11v2-CTLA-4 purificado, el anticuerpo activable antiJagged 5342-11v2-CTLA-4, anti-EGFR C225v5-CTLA-4 o el anticuerpo activable 3954-1204-C225v5 CTLA-4 se aplicaron a la placa y se dejaron unir. Anticuerpo de unión se visualizó con un conjugado anti-IgG-HRP humano (específico de Fab. Sigma, St Louis, MO; Cat # A0293-1ML) y se desarrolló con el sustrato cromogénico TMB. La especificidad de la unión se demostró mediante la incapacidad de las fusiones de anticuerpo-OKT3, específicas para CD3ε HUMANO, para unirse.

EJEMPLO 3: Unión de OKT3 a CD3ε

Como se muestra en la Fig. 13, los experimentos de unión a ELISA revelaron que el anticuerpo activable multispecífico anti-EGFR 3954-1204-C225v5-OKT3 y el anticuerpo activable multispecífico anti-Jagged 5342-1204-4D11v2 OKT3 se unen específicamente al CD3ε humano. Se adsorbió CD3ε humano (NovoProtein, Cat# C578) a los pocillos de una placa de ELISA de 96 pocillos. Se aplicó el anticuerpo activable multispecífico anti-EGFR purificado 3954-1204-C22Sv5-CTLA-4, anticuerpo activable multispecífico anti-EGFR 3954-1204-C225v5-OKT3, anticuerpo activable multispecífico anti-Jagged 5342-1204-4D11v2- CTLA-4, o anticuerpo activable multispecífico anti-Jagged 5342-1204-4D11v2-OKT3 en la placa y se permitió que se unieran. El anticuerpo unido se visualizó con un conjugado anti-IgG-HRP humano (Fab específico, Sigma, Si Louis, MO: Cat # A0293-1ML) y desarrollado con el sustrato cromogénico TMB.

EJEMPLO 4: Activación de profeasa de anticuerpos activables multispecíficos.

Activación

Los anticuerpos multispecíficos y los anticuerpos activables multispecíficos se diluyeron en PBS hasta una concentración final de 0,8 mg/ml. UPA humana recombinante (R&D Systems. Catálogo 1310-SE) se agregó a una

concentración final de 700 nM y se incubó a 37 °C durante -20 h. Se retiraron las alícuotas de digestión y se prepararon para análisis SDS-PAGE, como se describe a continuación, y se diluyeron a 100 nM en PBS; Tween 20 al 0,05 % y albúmina de exfoliación bovina de 10 mg/mL para el análisis en ensayos de ELISA de unión.

- 5 Para PAGE, las muestras se desnaturalizaron a 70 °C durante 10 minutos en 1 x tampón de muestra LDS y se agregó TCEP a una concentración final de 40 mM antes de la electroforesis. Se cargaron seis µg de anticuerpo en un gel NuPAGE Bis-Tris al 10 % (Invitrogen) y las proteínas se separaron por tamaño usando el tampón de electroforesis MOPS. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie y los resultados se muestran en la Figura 14. El cambio en la movilidad de las cadenas ligeras del anticuerpo activable anti-EGFR 3954-1204- C225v5, anticuerpo activable multiespecífico anti-EGFR 3954-1204-C225v5-CTLA-4, el anticuerpo activable anti-Jagged 5342-1204-4D11v2. y el anticuerpo activable anti-Jagged multiespecífico 5342-1204-4D11v2-CTLA-4, en presencia de uPA, demuestran la activación proteolítica de los anticuerpos activables multiespecíficos. La falta de cualesquiera cambios en la movilidad de las fusiones de cadena pesada demuestra la resistencia a la escisión de proteasa.

15 Ensayos de Unión

- El panel A de la Figura 15 muestra que el anticuerpo activable multiespecífico anti-EGFR 3954-1204-C225v5-CTLA-4 se unió a EGFR, mediante ELISA, con menor afinidad (Kd = 12,8 nM) en comparación con C225v5 (3 nM) o con C225v5- CTLA-4 (0,33 nM). Sin embargo, una vez activado por uPA, anticuerpo activable multiespecífico anti-EGFR 3954-1204-C225v5 CTLA-4 se unió a EGFR con afinidad similar (0,45 nM) en comparación con C225v5 (0,21 nM) y C225v5-CTLA4 (0,33 nM). Es importante destacar que uPA no escindió el anti-CTLA4 scFv fusionado al extremo carboxilo de la cadena pesada: Como se ilustra en el panel B de la Figura 15, un tratamiento con uPA no tuvo ningún efecto de unión al CTLA4 humano.

- 25 De manera similar, el anticuerpo activable multiespecífico anti-Jagged 5342-1204-4D11v2-CTLA-4 se unió a Jagged 1. humano por ELISA, con menor afinidad (15 nM) en comparación con 4D11v2 (0,44 nM) o 4D11v2-CTLA4 (0,77 nM). Una vez activado, el anticuerpo activable multiespecífico anti-Jagged 5342-1204-4D11v2-CTLA-4 se unió a Jagged 1 humano con afinidad similar a 4D11v2 (0,54 nM) y 4D11v2-CTLA4 (0,92 nM) (Figura 15, panel C). El tratamiento uPA no tuvo efecto sobre la unión a CTLA4 (Figura 15, panel D). Las mediciones de unión a ELISA se realizaron de la siguiente manera. Jagged 1-Fc humano (R&D Systems; Cat #1277-JG-050), EGFR humano (R&D Systems; Cat# 344-ER-050) o CTLA4 humano (R&D Systems; Cat#325-CT-200/CF) se adsorbieron en pocillos de una placa ELISA de 96 pocillos. Se aplicaron diluciones triples, a partir de 100 nM, de anticuerpos no tratados y tratados con uPA, anticuerpos multiespecíficos o anticuerpos activables multiespecíficos a la placa y se dejaron asociar con el antígeno unido a la placa durante 1 hora. Después de la unión, el anticuerpo unido se visualizó con un conjugado anti-IgG-HRP humano (Fab específico, Sigma. St Louis, MO; Cat # A0293-1ML) y desarrollado con el sustrato cromogénico TMB.

EJEMPLO 5: Secuencias de anticuerpos multiespecíficos y de anticuerpos activables multiespecíficos adicionales

- 40 Este Ejemplo proporciona las secuencias de anticuerpos multiespecíficos adicionales y anticuerpos activables multiespecíficos adicionales.

Anticuerpo OKT3m scFv

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYN

QKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGG

GSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYD

TSKSLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEADAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR

(SEQ ID NO: 306)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAATGA
GCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCC
GGGTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACC GCCTATATGC
AGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGA
TCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGT
GGTAGTGGTGGCGGTGGTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGG
CAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGT
TAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCCGAAACGTTGGATTTATGAT
ACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCAT
ATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTG
GTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACCTGGAAATTAATCGT (SEQ ID
NO: 307)

Anticuerpo OKT3m scFv Lv
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

5

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHF
RSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO:
308)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCA
TGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCAC
CAGCCCCGAAACGTTGGATTTATGATACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTT
CGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATG
CAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAA
ACTGGAAATTAATCGT (SEQ ID NO: 309)

10

Anticuerpo OKT3m scFv Hv
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

15

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYN
QKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSS
(SEQ ID NO: 310)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGA
GCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGGTTAAACAGCGTCC
GGGTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCCTATATGC
AGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGA
TCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCTGACCGTTAGCAGC (SEQ ID
NO: 311)

Anticuerpo OKT3m scFv con enlazador largo para permitir que la unión al extremo C de la cadena pesada (HC) o la
cadena ligera (LC) de un anticuerpo o anticuerpo activable para producir un anticuerpo multiespecífico o un anticuerpo
activable, respectivamente
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

GGSGGGSGSGSGSGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVK
QRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARY
YDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSIIVLTQSPAISASPGKVTMTCSAS
SSVSVMNYYQQSGTSYSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYC
QQWSSNPFTFGSGTKLEINR* (SEQ ID NO: 290)

10 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

GGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAG
GCGGAGGTTCAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGT
TAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGGTTAA
CAGCGTCCGGGTTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCA
ACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCCT
CTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTAT
TATGATGATCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCTGACCGTTAGCAGCG
GTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCA
GAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAACTTACCATGACCTGTAGCGCCAGC
AGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCCGAAACGTTGGA
TTTATGATACAGCAAACTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGG
CACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGT
CAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAATCGTT
GA (SEQ ID NO: 291)

Anticuerpo OKT3m scFv con enlazador corto para permitir la unión al extremo N de la HC de un anticuerpo o anticuerpo
activable para producir un anticuerpo multiespecífico o anticuerpo activable respectivamente
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYN
QKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGG
SGGGSGGGGSIIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMNYQQSGTSYSPKRWIYD
TSKLASGVPAHFRSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGG
GS (SEQ ID NO: 292)

20 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGA
GCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCC
GGGTCAGGGTCTGGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCOCCTATATGC
AGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGA
TCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCCCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGT
GGTAGTGGTGGCGGTGGTTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGG
CAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGT
TAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACGTTGGATTATGAT
ACCAGCAAACTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCAT
ATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTG
GTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACTGCAAAATTAATCGTGGAGGTGGT
GGATCC (SEQ ID NO: 293)

- 5 Anticuerpo multiespecífico de cadena pesada C225v5-OKT3m-H-N (anticuerpo OKT3m unido al extremo N del anticuerpo C225v5 HC)
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYN
QKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWQGTTLTVSSGGG
GSGGGGSGGGGSGIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYD
TSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGG
GSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDY
NTPFTSRLSINKDNSKSKVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWQGTTLTVSAA
STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSFLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 294)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

10

CAGGTT'CAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCAAGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGA
 GCTGTAAAGCAAGCGGTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGT'TAAACAGCGTCC
 GGGTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAAC
 CAGAAATTCAAAGATAAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACC GCCTATATGC
 AGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGA
 TCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGT
 GGTAGTGGTGGCGGTGGTTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGG
 CAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGT
 TAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCCGAAACGTTGGATT'TATGAT
 ACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCAT
 ATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTG
 GTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACCTGGAAATTAATCGTGGAGGTGGT
 GGATCCCGAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGA
 GCATTACCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCA
 GAGCCCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTAT
 AACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAGCCAGGTGTTTT
 TTAATAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGAC
 CTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCT
 AGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA
 CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAA
 CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC
 TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
 GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
 TGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC
 TTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
 GTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
 AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCA
 GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC
 CT'TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
 CTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 295)

Anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-C de cadena pesada (anticuerpo OKT3m unido al extremo C del
 anticuerpo C225v5 HC)
 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWSGGNTDYNT
 PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWQGGLVTVSAAST
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNYHTQKSLSLSPGKGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGA
 SVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSS
 TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGQIVL
 TQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVP AHFRGSG
 SGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR* (SEQ ID NO: 296)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATT
 CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCC
 GGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGCGGCAACACCGATTATAACACC
 CCGTTTACCAGCCGCGCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTAAAA
 TGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATTA
 TGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACC
 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
 CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGG
 CGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
 TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
 TTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCGTCTTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT

CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAAGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTACGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGG
ATCAGGCGGAGGTGAGGTTTACGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCA
AGCGTTAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGG
TTAAACAGCGTCCGGGTGAGGCTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTA
TACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGC
ACCGCCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCAC
GCTATTATGATGATCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAG
CAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTTACGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTG
ACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCG
CCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACG
TTGGATTTATGATACCAGCAAACTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGT
AGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAACGAGAAGATGCAGCAACCTATT
ATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAA
TCGTTGA (SEQ ID NO: 297)

- 5 Anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-L-C de cadena ligera (anticuerpo OKT3m unido al extremo C del anticuerpo C225v5 LC)
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSR
FSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGSGGGSGGGSGGGQVQLQQS
GAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA
TLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGS
GGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQSGTSPKRWIYDTSKLASG
VPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR* (SEQ ID
NO: 298)

- 10 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

GACATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCT
 TTAGCTGCCGCGGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAA
 CGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGC
 TTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAGCGAAG
 ATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCAC
 CAACTGGAACGTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGGAACGTCCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGG
 CTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTGAGGTTCAGCTGCAGCAGAGC
 GGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATA
 CCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCCGGGTGAGGCTCTGGAATGGAT
 TGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCA
 ACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCGCCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAG
 AGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATCACTATAGCCTGGATTATTG
 GGGTCAGGGCACCAACCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCA
 GGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGG
 GTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCA
 GCAGAAAAGCGGCACCAGCCGAAACGTTGGATTATGATACCAGCAAACTGGCAAGCGGT
 GTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTA
 TGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTT
 TGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAATCGTTAG (SEQ ID NO: 299)

Anticuerpo multiespecífico C225v5(N297Q)-OKT3m-H-N de cadena pesada
 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGGLEWIGYINPSRGYTNYN
 QKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGG
 GSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYD
 TSKLASGVPAPHFRRSGSGTSYSILTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGG
 GSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDY
 NTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTTLTVSAA
 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 300)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAATGA
 GCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCC
 GGGTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAAC
 CAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACC GCCTATATGC
 AGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGA
 TCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGT
 CAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGT
 TAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACGTTGGATTTATGAT
 ACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCAT
 ATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTG
 GTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACCTGGAAATTAATCGTGGAGGTGGT
 GGATCCAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGA
 GCATTACCTGCACCGTGCAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCA
 GAGCCCCGGGCAAAGGCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTAT
 AACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAGCCAGGTGTTTT
 TTAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGAC
 CTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCT
 AGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA
 CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAA
 CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTTCAGGACTC
 TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
 GCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
 TGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC
 TTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGT
 GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
 AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCA
 GCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTC
 CTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
 CTCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 301)

5 Anticuerpo multiespecíficoC225v5(N297Q)-OKT3m-H-C de cadena pesada
 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWISGGNTDYNT
 PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTALYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAAST

KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGA
 SVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSS
 TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSGQIVL
 TQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAAHFRGSG
 SGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR* (SEQ ID NO: 302)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTA
 CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCC
 GGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGCGGCAACACCGATTATAACACC
 CCGTTTACCAGCCGCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAA
 TGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATTA
 TGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACC
 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
 CCTTGGGCTGCGTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGG
 CGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACG
 TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
 TTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAANTGCCAAGACAAAGCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
 CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGC
 CTGACCTGCGTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 GGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG

GTAAAGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTT CAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGG
ATCAGGCGGAGGT CAGGTT CAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCA
AGCGTTAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGG
TTAAACAGCGTCCGGGT CAGGGTCTGGAATGGATTGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTA
TACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGC
ACCGCTTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCAC
GCTATTATGATGATCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCTGACCGTTAG
CAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTT CAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTG
ACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCG
CCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACG
TTGGATTTATGATACAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGT
AGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATT
ATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAA
TCGTTGA (SEQ ID NO: 303)

Anticuerpo multiespecífico C225v5(N297Q)-OKT3m-L-C de cadena ligera
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

5

DIILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSR
FSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSLSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGSGGGGSGSGGGSGGGGSGGGQVQLQQS
GAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA
TLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKLASG
VPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR* (SEQ ID
NO: 298)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

GACATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCT
TTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAA
CGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGC
TTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCGTAGCATTAAACAGCGTGGAAAGCGAAG
ATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCAC
CAAACCTGGAACGTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT

10

GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGG
 CTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTGAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGC
 GGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATA
 CCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCCGGGTGAGGGTCTGGAATGGAT
 TGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCA
 ACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCGCCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAG
 AGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATCACTATAGCCTGGATTATTG
 GGGTCAGGGCACCACCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCA
 GCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGG
 GTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCA
 GCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACGTTGGATTTATGATACCAGCAAACTGGCAAGCGGT
 GTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTA
 TGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTGACAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTT
 TGGTAGTGGCACCAAACTGGAATTAATCGTTAG (SEQ ID NO: 299)

Anticuerpo C225v5(N297Q) de cadena pesada
 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

5

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNT
 PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAAST
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVESC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 336)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATT
 CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCC
 GGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGCGGCAACACCGATTATAACACC

10

CCGTTTACCAGCCGCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAA
TGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTATTATTGCGCGCGCGCTGACCTATTA
TGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGG
CGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCTCAGACCTACATCTGCAACG
TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCTTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGAACCTGAGGTCACATGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCTTACCGTCTTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCTTCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTTCCCTGTCTCCGG
GTAAATGA (SEQ ID NO: 337)

Anticuerpo activable de cadena ligera 3954-1204-C225v5
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

5

QQQSGQCISPRGCPDGPVVMYSSSGSGSGSGSLSGRSDNHGSSGTQILLTQSPVILSVS
PGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSI
NSVESEDIADYYCQNNNWPPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVT
HQLSSPVTKSFNREGEC* (SEQ ID NO: 304)

NUCEEOTIDE SEQUENCE

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCATCTCACCTCGTGGTTGTCCGGACGGCCCATACGTCATGT
ACGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGATCCGGTCTGAGCGGCCGTTCCGATAA
TCATGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGC
CCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTTCATT

10

GGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCAT
TAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATT
AACAGCGTGGAAGCGAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACTGGCCGA
CCACCTTTGGCGCGGGCACCAAACTGGAACGTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT
CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACGTGCTCTGTTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
GTAACCTCCAGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG
CACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACC
CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGAT
CTGGAGGTGGCGGTTACAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTCA
GGTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAATGAGC
TGTAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTAAACAGCGTCCGG
GTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAACCA
GAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCGCCTATATGCAG
CTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATC
ACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCAACCCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTGG
TAGTGGTGGCGGTGGTTACAGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCA
ATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTA
GCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACGTTGGATTTATGATAC
CAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATAT
AGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGT
CAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAATCGTTAG (SEQ ID
NO: 305)

Anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, que comprende plásmido de cadena ligera 3954-1204-C225 y plásmido de cadena pesada C225v5-OKT3m-H-N.

5

Anticuerpo de cadena ligera C225v5
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

DIILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSR
FSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 314)

10

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

GACATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCT
 TTAGCTGCCGCGGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAA
 CGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGC
 TTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAGCGAAG
 ATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCAC
 CAACTGGAACTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGG
 CTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTGAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGC
 GGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAANTGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATA
 CCTTTACCCGTTTATACCATGCATTGGGTAAACAGCGTCCGGGTCAGGGTCTGGAATGGAT
 TGTTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCA
 ACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCGCCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAG
 AGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATCACTATAGCCTGGATTATTG
 GGGTCAGGGCACCACCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCA
 GCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGG
 GTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCA
 GCAGAAAAGCGGCACCAGCCGAAACGTTGGATTATGATACCAGCAAACTGGCAAGCGGT
 GTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTA
 TGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTT
 TGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAATCGTTAG (SEQ ID NO: 315)

- 5 La Tabla 11 muestra ejemplos de emparejamiento de secuencias de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) para producir un anticuerpo multispecifico o un anticuerpo multispecifico activable de la divulgación. Como se usa en esta invención cuando se hace referencia a cadenas ligeras, las cadenas ligeras de anticuerpos que comprenden C225v5 también se denominan cadenas ligeras que comprenden C225.

Tabla 11. Anticuerpos multispecificos y anticuerpos activables multispecificos de la descripción

Nombre de la proteína	Pares de plásmidos(nucleótidos) para transfección
C225v5-OKT3m-H-N	HC C225v5-OKT3m-H-N LC C225
C225v5-OKT3m-H-C	HC C225v5-OKT3m-H-C LC C225
C225v5-OKT3m-L-C	HC C225v5 LC C225-OKT3m4-C
3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N	HC C225v5-OKT3m-H-N LC C225-3954-1204

Nombre de la proteína	Pares de plásmidos(nucleótidos) para transfección
3954-1204-C225v5-OKT3m-H-C	HC C225v5-OKT3m-H-C LC C225-3954-1204
C225v5-N297Q-OKT3m-H-N	HC C225v5-N297Q-OKT3m-H-N LC C225
C225v5-N297Q-OKT3m-H-C	HC C225v5-N297Q-OKT3m-H-C LC C225
C225v5-N297Q-OKT3m-L-C	HC C225v5-N297Q LC C225-OKT3m-L-C
3954 -1204-C225v5-N297Q-OKT3m-H-N	HC C225v5-N297Q-OKT3m-H-N LC C225-3954-1204
3954-1204-C225v5-N297Q-OKT3m-H-C	HC C225v5-N297Q-OKT3m-H-C LC C225-3954-1204
3954-1204-C225v5-N297Q-OKT3m-L-C	HC C225v5-N297Q LC C225-3954-1204-OKT3m-L-C

vS se refiere a la versión 5 de C225.

EJEMPLO 6: Unión de anticuerpos multiespecíficos a CD3ε en células T .Jurkat

5

Este ejemplo demuestra la capacidad de anticuerpos multiespecíficos de la descripción para unirse a células T.

Se probaron tres formatos de anticuerpos multiespecíficos: (1) C225v5-OKT3m- H-N. un anticuerpo multiespecífico en el que un scFv de OKT3m que se une a CD3ε (también denominado en esta invención CD3ε y CD3 en células T) se unió al extremo N de la cadena pesada del anticuerpo anti-EGFR C225v5; (2) C225v5-OKT3m-H-C, un anticuerpo multiespecífico en el que un scFv de OKT3m se unió al extremo C de la cadena pesada de anti-EGFR anticuerpo C225v5; y (3) C225v5-OKT3m-L-C, un anticuerpo multiespecífico en el que un scFv de OKT3m se unió al extremo C de la cadena ligera del anticuerpo anti-EGFR C225v5. Las secuencias de aminoácidos de estos anticuerpos multiespecíficos se proporcionan en esta invención, al igual que las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos C225v5 y OKT3. También se evaluó un control de isotipo, a saber, control de isotipo de IgG₁ humana, Enzo, Catálogo ALX-804-133-C100.

Para determinar si los tres formatos de anticuerpos multiespecíficos podían unirse a células T Jurkat positivas para CD3ε (también denominadas en esta invención como células Jurkat y Jurkats), se realizó un ensayo de unión basado en citometría de flujo. Las células T Jurkat (clon E6-1, ATCC, TIB-152) se cultivaron en RPMI-1640 con GlutaMAX™ (Life Technologies, Catálogo 72400-120), suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (HI-FBS, Life Technologies, Catálogo 10438-026), penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml (Life Technologies, Catálogo 15140-122) (también denominada en esta invención como medio completo) según las pautas de ATCC. Las células se recogieron mediante centrifugación (200xg, 4 °C, 5 min) y se volvieron a suspender en PBS con HI-FBS al 2 % (tampón FACS). Se transfirieron alrededor de 250.000 células Jurkat por pocillo a una placa de fondo en U de 96 pocillos, se recogieron y se volvieron a suspender en 50 microlitros (también denominados en esta invención µL o µl) de los anticuerpos que se analizan. La concentración inicial de los anticuerpos fue de 100 nM para los anticuerpos multiespecíficos y 166,7 nM para el control de isotipo, seguido de diluciones en serie de 5 veces para un total de 8 concentraciones para cada anticuerpo.

Las células y anticuerpos se incubaron a 4 °C con agitación durante aproximadamente 1 hora, se recogieron y se lavaron 3 veces con 200 µL de tampón FACS. Las células Jurkat resultantes se resuspendieron en 50 µl de IgG antihumana conjugada con AlexaFluor® 647 (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Catálogo 709-606-149) y se incubaron a 4 °C con agitación durante alrededor de 30 min. Las células Jurkat resultantes se recogieron, se lavaron 3 veces con 200 µL de tampón FACS y se resuspendieron en un volumen final de 150 µL de tampón FACS con 2,5 µg/ml de 7-AAD (BD Pharmingen, Catálogo 559925). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD Biosciences), y la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células viables se calculó usando FlowJo V10 (Treestar). La tinción de 7-AAD mostró que una compuerta de dispersión lateral delantera era suficiente para identificar células

viables. Los valores de EC₅₀ se calcularon en GraphPad Prism 6 ajustando los datos al log(agonista) frente a la respuesta (tres parámetros).

La Figura 16A demuestra que los tres formatos de anticuerpos multiespecíficos unen células T Jurkat con valores EC₅₀ que varían de nM de un solo dígito a sub-nM.

EJEMPLO 7: Los anticuerpos multiespecíficos se unen a células T que expresan CD3ε y EGFR humano recombinante

Este Ejemplo demuestra la capacidad de los anticuerpos multiespecíficos de la descripción para unirse a células T (también denominadas en esta invención como co-unión) y células que contienen antígenos diana.

Para determinar si el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N, C225v5-OKT3m-H-C, o C225v5-OKT3m-L-C podría unirse a las células Jurkat T positivas para CD3ε y a EGFR, se realizó un ensayo de coagulación basado en citometría de flujo. Las células de Jurkat se pretrataron con una concentración de saturación de cada uno de los anticuerpos multiespecíficos seguida de titulación con EGFR biotinilado y detección con estreptavidina, conjugado de R-ficoeritrina (SAFE). También se analizó un control isotípico, a saber, IgG₁ humana; control isotípico, Enzo. Catálogo ALX-804-133-C100.

Las células Jurkat se cultivaron y recogieron como se describe en esta invención. Alrededor de 500.000 células Jurkat por pocillo se transfirieron a una placa de fondo en U, se recogieron y se resuspendieron en 50 µL de anticuerpo multiespecífico 40 nM o anticuerpo de isotipo 67 nM. Las células se incubaron a 4 °C con agitación durante alrededor de 1 hora, se recogieron y se lavaron 3 veces con 200 µL de tampón FACS. Las células Jurkat resultantes (que se unen a un anticuerpo multiespecífico de la descripción) se resuspendieron en 50 µL de proteína EGFR humana recombinante biotinilada (Abeam, Catálogo ab 168702) comenzando en alrededor de 290 nM seguido de diluciones en serie 5 veces para un total de 8 concentraciones. Las células se incubaron a 4 °C con agitación durante alrededor de 1 hora, se recogieron y se lavaron 3 veces con 200 µL de tampón FACS. Las células Jurkat resultantes se resuspendieron en 50 µL 10 µg/ml de estreptavidina, conjugado de R-Ficocritina (Life Technologies, S866) y se incubaron a 4 °C con agitación alrededor de 1 hora. Las células se recogieron, se lavaron una vez con 200 µL de tampón FACS y se resuspendieron en 150 µL de tampón FACS. Las muestras se analizaron en un BD Accuri C6 y MFI calculado como se describe en esta invención. Los valores de EC₅₀ se calcularon en Graph Pad Prism 6 como se describe en esta invención.

La Figura 16B demuestra que los tres formatos de anticuerpos multiespecíficos exhibieron unión dependiente de la concentración de EGFR que requirió unión concomitante a CD3ε en células T. Los valores de EC₅₀ variaron de sub-nM a nM de un solo dígito.

EJEMPLO 8 Activación dependiente de la diana de células T por anticuerpos multiespecíficos

Este Ejemplo demuestra la capacidad de anticuerpos multiespecíficos de la divulgación para activar células T de una manera dependiente de la diana.

Para determinar si la unión de células T Jurkat y células diana positivas para EGFR mediante el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N, C225v5-OKT3m-H-C, o C225v5-OKT3m-L-C podría inducir la activación de células Jurkat, se empleó un ensayo basado en citometría de flujo. Las células Jurkat y las células diana marcadas con CFSE se co-cultivaron durante aproximadamente 15 h y la activación de células T se evaluó mediante tinción para la expresión superficial del marcador de activación de células T tempranas, CD69.

Células SW480 positivas para EGFR, también denominadas células SW480, (ATCC, Catálogo CCL-228) y células U266 negativas para EGFR, también denominadas células U266, (ATCC, Catálogo TIB-196) se cultivaron en RPMI-1640 con GlmaMAX™, HI-FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (denominada medio completo) según las pautas de ATCC. Estas células diana se recogieron, se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en PBS a 2x10⁵ células/ml. Un stock de CFSE de 5 mM (Life Technologies, Kit de proliferación celular CellTracc™ CFSE, Catálogo C34554) se preparó en DMSO y luego se diluyó a 30 nM en PBS. El stock de trabajo de PBS/CFSE se utilizó inmediatamente. Se combinaron volúmenes iguales de las células diana y el stock de CFSE para una concentración final de CFSE de 15 nM y una densidad celular final de 1x10⁶ células/ml. Las células se incubaron durante 15 min a 37 °C. El etiquetado se inactivó mediante la adición de un volumen igual de HI-FBS. Las células diana incubadas se recogieron, se lavaron una vez con medio completo y se volvieron a suspender en medio completo a 5x10⁵ células/ml. Se añadieron 50 µL de suspensión celular por pocillo a una placa de fondo plano de 96 pocillos para un total de 25.000 células diana por pocillo.

Células T Jurkat se cultivaron como se describe en esta invención. Las células Jurkat se recogieron, se resuspendieron en medio completo a 1 x 10⁶ células/ml y se añadieron 50 µL de suspensión celular por pocillo a la placa de fondo plano que contenía células diana para un total de aproximadamente 50.000 células Jurkat por pocillo. La proporción de células T efectoras a células diana fue de 2:1.

Se prepararon stocks de anticuerpos concentrados tres veces en medios completos. Las concentraciones más altas utilizadas fueron 1,2 nM para cada uno de los formatos de anticuerpos multiespecíficos y 1,5 nM para OKT3 (BioLegend, Catálogo 317304), C225v5 (cuya secuencia de aminoácidos se proporciona en esta invención), y anticuerpos de control de isotipo. Se prepararon diluciones en serie de cinco veces en medios completos para un total de 8 concentraciones para cada anticuerpo. Se agregaron 50 µL de anticuerpo por pocillo a la placa de fondo plano que contenía las células T y las células diana, diluyendo todos los stocks 3 veces para una concentración inicial de 400 pM para cada uno de los formatos de anticuerpos multiespecíficos o 500 pM para cada uno de los OKT3, C225v5 y anticuerpos de isotipo.

Después de aproximadamente 15 h, las células se transfirieron a una placa con fondo en U y se recogieron. Para maximizar la recuperación, la placa de cultivo celular se lavó con 150 µL de tampón FACS y el lavado se transfirió a la placa de fondo en U. Las células se recogieron, se volvieron a suspender en anticuerpo conjugado PE anti-CD69 de 50 µL (BD Biosciences, Catálogo 555531, utilizado a la concentración recomendada por el fabricante), y teñido durante 1 h a 4 °C con agitación. Las células se lavaron una vez con 200 µL de Tampón FACS y luego se resuspendieron en un volumen final de 150 µL. Se utilizaron controles de un solo color para establecer la compensación en el BD Accuri C6. Se recogieron 10.000 células en una dispersión lateral delantera, compuerta CFSE negativa y MFI calculada usando FlowJo. Los valores de EC₅₀ se calcularon en GraphPad Prism 6 como se describe en esta invención.

La Figura 17 demuestra que la activación de CD69 potente, evidente a partir de concentraciones sub-pM, dependía de que cada formato de anticuerpo multiespecífico se co-cultivara en presencia de células T Jurkat y células SW480 EGFR-positivas. En contraste, la activación de células T inducida por co-cultivo con células U266 negativas para EGFR fue significativamente menos eficiente, presentando valores de EC₅₀ sub-nM y una reducción del 75 % en la inducción máxima de CD69 con respecto a la activación inducida por células positivas para EGFR. La activación independiente de EGFR de los anticuerpos multiespecíficos, como se vio cuando se usaron células U266, fue similar a la del anticuerpo OKT3, y se observó tinción de CD69 insignificante con C225v5 y anticuerpos de control isotípicos.

EJEMPLO 9: Activación dependiente de la diana de células T CD8⁺ primarias por anticuerpos multiespecíficos

Este Ejemplo demuestra la capacidad de anticuerpos multiespecíficos de la descripción para activar células T CD8 positivas primarias (CD8').

Para determinar si el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N, C225v5-OKT3m-H-C, o C225v5-OKT3m-L-C podría mediar la activación dependiente de EGFR de células T CD8' humanas primarias, se realizó un ensayo basado en citometría de flujo. Células T CD8' derivadas de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y células diana marcadas con DDAO-SE se co-cultivaron durante la noche, y la activación se evaluó mediante tinción para el marcador de activación temprana. CD69.

Células SW480 positivas para EGFR se cultivaron y etiquetaron como se describe en esta invención con las siguientes excepciones: (1) Células diana SW480 se marcaron con CellTrace™ FarRed DDAO-SE (Life Technologies, Catálogo C34553) y (2) medios completos se complementaron con 25 U/ml de IL-2 (R&D Systems, Catálogo 202-IL-050/CF). Se añadieron cincuenta 50 µL de suspensión de células diana (a 5x10³ células/ml) por pocillo a una placa de fondo plano de 96 pocillos para un total de 25.000 células diana por pocillo.

Células T citotóxicas CD8⁺ de sangre periférica normal fresca (AllCells, Catálogo PB009-3) se obtuvieron de AllCells (Alameda, CA), se recogieron mediante centrifugación (200xg, RT, 15 min) y se volvieron a suspender en medios completos complementados con 25U/ml IL-2 a 1,5x 10⁶ células/ml. Cincuenta µL de suspensión celular por pocillo se añadieron a la placa de fondo plano que contiene células diana para un total de aproximadamente 75.000 células T citotóxicas CD8⁺ por pocillo y una relación de 3:1 de células T a células diana.

Se prepararon stocks de anticuerpos tres veces concentrados en medios completos complementados con 25U/ml IL-2. La concentración más alta fue de 600 pM seguida de diluciones en serie de 5 veces para un total de ocho concentraciones para cada anticuerpo. Se añadieron 50 µL de anticuerpo por pocillo a la placa de fondo plano que contenía células CD8' y células diana, diluyendo todos los stocks 3 veces para una concentración inicial de 200 pM.

Después de una incubación durante la noche, la placa de fondo plano se centrifugó y se retiraron 100 µL de sobrenadante para el ensayo de citotoxicidad luminiscente descrito en esta invención. El sobrenadante restante se transfirió a una placa de fondo en U, y las células en la placa de fondo plano se separaron con tripsina al 0,25 % (Life Technologies, Catálogo 25200-056). La actividad de tripsina se inactivó mediante la adición de 3 volúmenes de Tampón FACS y la suspensión celular se transfirió a la placa de fondo en U. Después de la recogida, las células se resuspendieron en 50 µL de un cóctel de FITC anti-CD69 PE/Anti-CD8 (FITC anti-CD8, BD Biosciences, Catálogo 561948), control de isotipo FITC (BD BioSciences, Catálogo 340755). o control de isotipo PE (BD BioSciences, Catálogo 340761). Todos los anticuerpos se utilizaron a las concentraciones recomendadas por el fabricante. Las células se tiñeron durante 1 h a 4 °C con agitación, se recogieron y se resuspendieron en un volumen final de 150 µL de tampón FACS con 2,5 µg/ml de 7-AAD. Se utilizaron controles de un solo color para establecer la compensación en un BD Accuri C6 y se recogió un volumen fijo de suspensión celular. La regulación en células CD8' fue suficiente

para distinguir entre células diana y células T viables. La activación se cuantificó como el porcentaje de células T con expresión de CD69 por encima del control de isotipo de PE.

La Figura 18A demuestra que los tres formatos de anticuerpos multiespecíficos demostraron la activación dependiente de la concentración de células T CD8⁺ primarias con valores de pM EC₅₀ de un solo dígito. El tratamiento con anticuerpos OKT3, C225v5 o de control de isotipo (Enzo) de IgG1 humana dio como resultado una inducción de CD69 insignificante.

EJEMPLO 10: Destrucción dependiente de diana de células diana por anticuerpos multiespecíficos

Este ejemplo demuestra la capacidad de los anticuerpos multiespecíficos de la descripción para inducir la lisis celular dependiente de diana dirigida por células T.

Para determinar si el anticuerpo multiespecífico C225v5-GKT3m-H-N, C225v5- OKT3m-H-C, o C225v5-OKT3m-L-C era capaz de inducir lisis celular dirigida a células T, dependiente de la diana, se cocultivaron células SW480 con células T CD8⁺ a una relación de células efectoras a diana 3:1 como se describe en esta invención. Después de una incubación nocturna, 100 µL del sobrenadante se analizaron en placas de pared blanca de 96 pocillos (Greiner Bio One, Catálogo 655098) para determinar la actividad de proteasa distinta asociada con la citotoxicidad según el protocolo del fabricante (CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay, Catálogo G9292, Promega), que utiliza un sustrato peptídico luminogénico para medir la actividad de las proteasas liberadas por células que han perdido la integridad de la membrana y posteriormente se han sometido a citólisis. La citotoxicidad multiespecífica dependiente de anticuerpos de las células diana se expresó en luminiscencia después de la sustracción de fondo de los valores no tratados y se graficó en Prisma con análisis de ajuste de curva log(agonista) vs. respuesta (tres parámetros).

La Figura 18B demuestra que los tres formatos de anticuerpos multiespecíficos indujeron la destrucción de células SW480 mediada por células T. Como se esperaba, el anticuerpo OKT3 solo no exhibió destrucción detectable de células SW480, lo que sugiere un requisito de co-acoplamiento de CD3 y diana tumoral para la citotoxicidad efectiva por los anticuerpos multiespecíficos.

EJEMPLO 11: Activación de células T dependientes de diana y destrucción de células diana por anticuerpos multiespecíficos

Este Ejemplo demuestra la capacidad de los anticuerpos multiespecíficos de la descripción para inducir la activación dirigida a células T, dependiente de la diana, de células T CD8⁺ y la destrucción de células diana.

Para determinar si la activación de células T observada dependía de la expresión de EGFR por parte de la célula diana, se cocultivaron células SW480 positivas para EGFR marcadas con CFSE o células U266 negativas para EGFR con células T CD8⁺ humanas en presencia del anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N u OKT3, cada uno en una serie de dilución de 5 veces a partir de 200 pM como se describió anteriormente. Se utilizó el marcado CFSE de las células diana (30 nM) para distinguir las células diana de las células T utilizando un procedimiento descrito en esta invención. Células T citotóxicas CD8⁺ de sangre periférica normal congeladas (AllCells, Catálogo PB009-3F) se descongelaron según lo especificado por el fabricante. Después de una incubación durante la noche, se analizaron las células T (células negativas a CFSE) para determinar la expresión superficial del marcador de activación temprana, CD69, tal como se describe en esta invención. Brevemente, las células se retiraron de la placa de ensayo, las células adherentes se levantaron usando tripsina (Life Technologies) y las células se lavaron una vez con tampón FACS. Las células se tiñeron durante 1 hora con anti-CD69-PE (BD Bioscience). Las células se lavaron y analizaron en el BD Accuri C6 para la expresión de CD69 en la superficie celular. Los valores de MFI se calcularon como se describe en esta invención. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células T con expresión de CD69 por encima del control de isotipo usando el software de análisis FCS Express y se graficaron en Prism con el análisis de ajuste de curva log(agonista) vs. respuesta (tres parámetros).

Como se muestra en la Figura 18C, el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N demostró una potente activación de células T a concentraciones sub-pM en presencia de células SW480 y solo una mínima activación de células T por células U266, incluso a concentraciones que eran mayores que 3 logs más altas que las concentraciones utilizadas con células SW480. El anticuerpo OKT3 exhibió una activación mínima de células T. Estos resultados demostraron que la activación efectiva de células T depende de la expresión de células diana de EGFR.

Para determinar la dependencia de la expresión de EGFR para la destrucción de células diana, se midieron 100 µl de sobrenadante del co-cultivo de células T con células SW480 o U266 para determinar la actividad de la proteasa asociada con la citotoxicidad (CytoTox-Glo, Promega). Los resultados se expresaron en luminiscencia sin sustracción de fondo para mostrar la respuesta de U266 y se graficaron en Prisma con análisis de ajuste de curva log (agonista) vs. respuesta (tres parámetros).

La Figura 18D ilustra que el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N provoca citotoxicidad de células SW480 que expresan EGFR a concentraciones sub-pM mientras que no se detecta destrucción discernible de células U266 negativas para EGFR. El anticuerpo OKT3 tampoco mostró destrucción discernible de células SW480 o U266.

EJEMPLO 12: Capacidad de anticuerpos multiespecíficos para acoplarse a células T para destruir un panel de líneas celulares que expresan EGFR

- 5 Este Ejemplo demuestra la capacidad de los anticuerpos multiespecíficos de la descripción de acoplarse a células T para destruir un panel de líneas celulares que expresan EGFR.

Para determinar si el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N fue capaz de inducir citotoxicidad de líneas celulares adicionales que expresan EGFR, se cocultivaron células T CD8 humanas m RPM1-1640, suero humano al 2 % en placas de 96 pocillos de pared blanca con las siguientes líneas celulares que expresan EGFR en una relación efector a diana de 5:1 (con la excepción de las células U266, que se utilizaron en una relación 3:1 cultivadas en placas de fondo plano de 96 pocillos) y una titulación de anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N: HEK-293, HCT-15, HCT 116, Hs 766T, HT- 29, NCI-H2405, SW480, SK-OV-3, y una línea celular negativa para EGFR, U266 (todas líneas celulares de ATCC). Se utilizó el anticuerpo anti-EGFR C225v5 (a 200 pM) como control negativo. Después de una incubación durante la noche, se añadió el sustrato peptídico luminogénico del ensayo de citotoxicidad CytoTox-Glo™ (Promega) directamente a las placas (150 µl de sobrenadante) para medir la actividad de proteasa liberada, con la excepción de las muestras U266, donde se utilizaron 100 µl de sobrenadante de U266 para evaluar la actividad de proteasa. Los resultados se expresaron en luminiscencia después de la sustracción del fondo de los valores no tratados y se graficaron en Prism con análisis de ajuste de curva log(agonista) vs. respuesta (tres parámetros).

La Figura 19 demuestra que todas las líneas celulares que expresan EGFR tratadas con el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N en presencia de células T CD8⁺ exhibieron citotoxicidad dependiente de la dosis, en contraste, las células U266 negativas para EGFR no se vieron afectadas por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OT3m-H-N. Ninguna de las líneas celulares tratadas con el anticuerpo anti-EGFR C225v5 a 200 pM exhibió evidencia de citotoxicidad, independientemente de su expresión de EGFR.

EJEMPLO 13: Atenuación de la unión de EGFR por anticuerpos activables multiespecíficos

- 30 Este Ejemplo demuestra que la unión de EGFR por un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción se atenúa en comparación con la unión de EGFR por un anticuerpo multiespecífico de la descripción. Este Ejemplo también demuestra que la unión de EGFR del anticuerpo activable multiespecífico, que incluye un resto escindible de proteasa, se restaura tras la escisión del anticuerpo activable multiespecífico mediante dicha proteasa.

- 35 Se evaluaron el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, anticuerpo activable activado multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N y el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N para determinar su capacidad de unirse a células SW480 que expresan EGFR.

La activación del anticuerpo activable multiespecífico se llevó a cabo como sigue; 825 µg de anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N en PBS se escindió mediante la adición de matriptasa valorada en el sitio activo (también denominado en esta invención MT-SP1 y MTSP1: disponible en R&D Systems, Catálogo 3946-SE-010) a una concentración final de 100 nM. El digesto se incubó a 37° C durante la noche y la escisión se confirmó mediante la eliminación de una alícuota para el análisis de electroforesis capilar (GX-II Capillary Electrophoresis, Perkin Elmer). La proteasa y el resto de enmascaramiento escindido se eliminaron mediante purificación con proteína A. En resumen, la muestra .sample digerida se diluyó a 2 ml con PBS Wish y se cargó en perlas MabSelect SuRe™ equilibradas (GE Healthcare Life Sciences, Producto 11-0026-01 AD). Las perlas se lavaron con 5 volúmenes de columna (CV) de 1xPBS, seguido de 5 CV de 5xPBS complementado con alcohol isopropílico (IPA) al 5 % y, finalmente, con 5 CV de 1xPBS. El anticuerpo se eluyó con 10 CV de glicina 0,1 M, pH 3,0, y las fracciones húmedas se neutralizaron con Tris 1 M, pH 8,0, se agruparon, se concentraron y se intercambiaron en tampón en PBS.

- 50 Las células SW480, que expresan EGFR, se levantaron con tampón de disociación celular (Sigma, Catálogo C5789), se lavaron e incubaron durante 1 hora con una dilución 5 veces de 1000 nM de anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, anticuerpo activable multiespecífico activado 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N, anticuerpo activable 3954-1204-C225v5, o anticuerpo C225v5 en tampón FACS en hielo. Las células se lavaron 3 veces con tampón FACS y se incubaron con 1:400 de un anticuerpo secundario, a saber, AF488 específico de FcGamma antihumano (Jackson ImmunoResearch, Catálogo 109-546-098) en tampón FACS en hielo. Las células se lavaron 3 veces con tampón FACS, y el MFI de AF488 se leyó en el citómetro de flujo BD Accuri (BD Biosciences). El MFI de una muestra que comprende solo el control de anticuerpo secundario se restó del MFI experimental y se graficó en Prism con análisis de ajuste de curva log(agonista) vs. respuesta (tres parámetros).

La Figura 20A demuestra que la unión de EGFR por el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N se atenúa en comparación con la unión de EGFR por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N, pero la unión de EGFR del anticuerpo activable multiespecífico se restauró completamente tras la escisión de la proteasa del anticuerpo activable multiespecífico por la matriptasa. La Figura 20B muestra que la unión de EGFR por el anticuerpo C225v5 y por el anticuerpo activable 3954-1204-C225v5 fueron comparables a la unión de EGFR por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N y el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-

H-N, respectivamente, lo que demuestra que el resto anti-CD3 ϵ presente en el formato multiespecífico alteró el perfil de unión de EGFR del anticuerpo multiespecífico o del anticuerpo activable multiespecífico.

EJEMPLO 14: Capacidad de anticuerpos activables multiespecíficos para unirse a células T CD3⁺

Este ejemplo demuestra que un anticuerpo activable multiespecífico, un anticuerpo activable multiespecífico activado y un anticuerpo multiespecífico, todas las realizaciones, son capaces de unirse a células T CD3⁺.

Para determinar si la unión de CD3 ϵ se había visto afectada por el enmascaramiento del sitio de unión de EGFR de un anticuerpo activable multiespecífico anti-EGFR, se realizó un ensayo de unión de células T Jurkat como se describe en esta invención con el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, anticuerpo activable multiespecífico activado 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, y anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N. Las células Jurkat se incubaron con una dilución de 5 veces de 1000 nM de anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, anticuerpo activable multiespecífico activado con matriptasa 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N o anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N en tampón FACS durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron 3 veces y se incubaron con un anticuerpo secundario, a saber, 1:400 de AF488 específico de FcGamma antihumano (Jackson ImmunoResearch). Las células se lavaron 3 veces, y el MFI de AF488 se leyó en el citómetro de flujo BD Accuri (BD Biosciences). El MFI de una muestra que comprende solo el control de anticuerpo secundario se restó del MFI experimental y se graficó en Prism con análisis de ajuste de curva log(agonista) vs. respuesta (tres parámetros i.).

La Figura 21A demuestra que el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N y el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N presentan una unión equivalente a las células T Jurkat. La Figura 21B demuestra que el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N y el anticuerpo activable multiespecífico activado 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N presentan una unión equivalente a células T Jurkat. Estos resultados indican que el enmascaramiento del resto de unión a EGFR del anticuerpo activable multiespecífico no afecta la capacidad del anticuerpo activable multiespecífico para acoplarse a células T.

EJEMPLO 15: Activación de células T dependientes de diana por anticuerpos activables multiespecíficos

Este ejemplo demuestra que la activación de células T dependientes de diana mediante un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción se atenúa en comparación con la activación exhibida por un anticuerpo multiespecífico de la descripción. Este Ejemplo también demuestra que la activación de células T dependiente de diana por el anticuerpo activable multiespecífico, que incluye un resto escindible de proteasa, se restaura tras la escisión del anticuerpo activable multiespecífico por dicha proteasa.

Para determinar si el enmascaramiento del sitio de unión a EGFR de un anticuerpo activable multiespecífico EGFR atenúa la activación de células T dependiente de diana y para determinar si la activación de la proteasa del anticuerpo activable multiespecífico restaura la activación, se realizó un ensayo de activación Jurkat, como se describe en esta invención, analizando el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, el anticuerpo activable multiespecífico activado 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N, anticuerpo anti-EGFR C225v5, y un control isotípico Synagis (Mcdimmune) como se describe en esta invención.

La Figura 22 demuestra que la activación dependiente de EGFR, determinada por la inducción de CD69 de células T Jurkat cocultivadas con células SW480 que expresan EOFR, por el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N se atenuó en comparación con la activación dependiente de EGFR exhibida por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N. La Figura también indica que la activación dependiente de EGFR por el anticuerpo activable multiespecífico se restauró completamente tras la escisión de proteasa del anticuerpo activable multiespecífico por matriptasa. Ni el anticuerpo anti-EGFR C225v5 ni el anticuerpo de control de isotipo presentaron activación de células T.

EJEMPLO 16: Activación de células T dependientes de diana y destrucción de células diana por anticuerpos activables multiespecíficos

Este ejemplo demuestra que la activación y destrucción de células T dependiente de diana de células diana mediante un anticuerpo activable multiespecífico de la descripción se atenúa en comparación con la activación exhibida por un anticuerpo multiespecífico de la descripción. Este Ejemplo también demuestra que la activación y destrucción de células T dependiente de diana de células diana por el anticuerpo activable multiespecífico, que incluye un resto escindible de proteasa, se restaura tras la escisión del anticuerpo activable multiespecífico por dicha proteasa.

Para determinar si el enmascaramiento del sitio de unión a EGFR de un anticuerpo activable multiespecífico anti-EGFR atenúa la activación dependiente de diana y para determinar si la activación de la proteasa del anticuerpo activable multiespecífico restaura la activación, se realizó un ensayo de activación Jurkat, como se describe en esta invención, analizando el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, el anticuerpo activable multiespecífico activado 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N, el anticuerpo anti-CD3 ϵ OKT3, el anticuerpo anti-EGFR C225v5, y un control de isotipo como se describe en esta

invención.

Para determinar el impacto del enmascaramiento del sitio de unión a EGFR de un anticuerpo activable multiespecífico anti-EGFR sobre la citotoxicidad y la capacidad de activación de proteasa para restaurar la actividad citotóxica del anticuerpo activable multiespecífico activado, células SW480 que expresan EGFR se co-cultivaron con células T en una relación de células efectoras a diana de 5:1, con una serie de dilución de 5 veces, a partir de 200 pM, de anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, anticuerpo activable multiespecífico activado 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N, o anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N. Se usaron como controles 200 pM de OKT3, C225v5, y anticuerpos IgG1 de Synagis (Medimmune) de control de isotipos. Después de una incubación durante la noche, se analizaron 100 µL del sobrenadante en placas de 96 pocillos de pared blanca con actividad de proteasa distinta asociada con citotoxicidad (CytoTox-Glo, Promega). Los resultados se expresaron en luminiscencia después de la sustracción del fondo de los valores no tratados y se graficaron en Prisma con análisis de ajuste de curva log(agonista) vs. respuesta (tres parámetros).

La Figura 23A demuestra que la activación dependiente de EGFR, según lo determinado por inducción de CD69 de células T primarias cocultivadas con células SW480 que expresan EGFR, mediante el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N se atenuó en comparación con la activación dependiente de EGFR exhibida por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N. La figura también indica que la activación dependiente de EGFR mediante el anticuerpo activable multiespecífico se restauró completamente tras la escisión de proteasa del anticuerpo activable multiespecífico mediante matriptasa. Los anticuerpos de control de isotipo OKT3, anti-EGFR C225v5 y Synagis IgG1 exhibieron una activación insignificante de células T.

La Figura 23B demuestra que la lisis dependiente de EGFR de células SW480 por el anticuerpo activable multiespecífico 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N se atenuó en comparación con la citotoxicidad dependiente de EGFR exhibida por el anticuerpo multiespecífico C225v5-OKT3m-H-N. La Figura también indica que la citotoxicidad dependiente de EGFR por el anticuerpo activable multiespecífico se restauró completamente tras la escisión de proteasa del anticuerpo activable multiespecífico por matriptasa. Los anticuerpos de control de isotipo C225v5 y OKT3 y Synagis IgG1 exhibieron citotoxicidad insignificante.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CytomX Therapeutics, Inc.

<120> ANTICUERPOS MULTIESPECÍFICOS ANTICUERPOS ACTIVABLES MULTIESPECÍFICOS Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE LOS

<130> CYTM-025/N01EP 322001-2236

<140> 14748461.2 <141> 2014-07-25

<150> US 61/858,402
<151> 2013-07-25

<160> 339

<170> Version de patente 3.5

<210> 1
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Primer CTRRevNot

<400> 1
tcqaqcqcc gctcaactag ctgaagagac agtg 34

<210> 2
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Primer CTFForOL

ES 2 912 932 T3

<400> 2
gccctctaga ctcqatctaq ctagctgaag agacagtgac cagg 44

5 <210> 3
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificialÇ

10 <220>
<223> Primer HCForNhe

<400> 3
ctcagctagc accagggccc atcggtc 27

15 <210> 4
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Primer HCRevOL

<400> 4
ctttacccq agacaggag aggctctct qc 32

25 <210> 5
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Primer OKRZVNot

<400> 5
ctcqaqcqcq cqctcaacqa ttaattcca gtttg 35

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> anti-Jagged VH CDR1

45 <400> 6

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> anti-Jagged VH CDR2

55 <400> 7

Ser Ile Asp Pro Glu Gly Arg Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

60 <210> 8
<211> 10

ES 2 912 932 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> anti-Jagged VH CDR3

 <400> 8

 Asp Ile Gly Gly Arg Ser Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10
 10
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> anti-Jagged VL CDR1

 <400> 9
 20
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

 <210> 10
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> anti-Jagged VL CDR2
 30
 <400> 10

 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 35
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> anti-Jagged VL CDR3

 <400> 11

 Gln Gln Thr Val Val Ala Pro Pro Leu
 1 5
 45
 <210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> anti-EGFR VH CDR1

 <400> 12
 55
 Asn Tyr Gly Val His
 1 5

 <210> 13
 60 <211> 16
 <212> PRT

ES 2 912 932 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> anti-EGFR VH CDR2
 5
 <400> 13
 Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
 1 5 10 15
 10
 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> anti-EGFR VH CDR3
 <400> 14
 Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
 1 5 10
 20
 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 25
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> anti-EGFR VL CDR1
 30
 <400> 15
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10
 35
 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> anti-EGFR VL CDR2
 40
 <400> 16
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5
 45
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> anti-EGFR VL CDR3
 <400> 17
 Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
 1 5
 55
 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 60
 <213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> péptido de enlace	
5	<220>	
	<221> REPETIR	
	<222> (1)..(5)	
	<223> Podrían repetirse	
10	<400> 18	
		Gly Ser Gly Gly Ser 1 5
15	<210> 19	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> péptido de enlace	
25	<220>	
	<221> REPETIR	
	<222> (1)..(4)	
	<223> Podrían repetirse	
	<400> 19	
		Gly Gly Gly Ser 1
30	<210> 20	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> péptido de enlace	
	<400> 20	
40		Gly Gly Ser Gly 1
45	<210> 21	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> péptido de enlace	
	<400> 21	
		Gly Gly Ser Gly Gly 1 5
55	<210> 22	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> péptido de enlace	
	<400> 22	

ES 2 912 932 T3

		Gly Ser Gly Ser Gly 1 5
5	<210> 23 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> péptido de enlace <400> 23	
15		Gly Ser Gly Gly Gly 1 5
20	<210> 24 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido de enlace <400> 24	
25		Gly Gly Gly Ser Gly 1 5
30	<210> 25 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido de enlace	
35	<400> 25	
40		Gly Ser Ser Ser Gly 1 5
45	<210> 26 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible <400> 26	
50		Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His 1 5
55	<210> 27 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible	
60	<400> 27	

ES 2 912 932 T3

		Thr Gly Arg Gly Pro Ser Trp Val
		1 5
5	<210> 28 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> secuencia escindible <400> 28	
		Ser Ala Arg Gly Pro Ser Arg Trp
		1 5
15	<210> 29 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> secuencia escindible <400> 29	
		Thr Ala Arg Gly Pro Ser Phe Lys
		1 5
25	<210> 30 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> secuencia escindible <400> 30	
35		Gly Gly Trp His Thr Gly Arg Asn
		1 5
40	<210> 31 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> secuencia escindible <400> 31	
		His Thr Gly Arg Ser Gly Ala Leu
		1 5
50	<210> 32 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> secuencia escindible <400> 32	
60		Pro Leu Thr Gly Arg Ser Gly Gly
		1 5

ES 2 912 932 T3

5	<210> 33 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible	
10	<400> 33	Ala Ala Arg Gly Pro Ala Ile His 1 5
15	<210> 34 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible	
20	<400> 34	Arg Gly Pro Ala Phe Asn Pro Met 1 5
25	<210> 35 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible	
30	<400> 35	Ser Ser Arg Gly Pro Ala Tyr Leu 1 5
35	<210> 36 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible	
40	<400> 36	Arg Gly Pro Ala Thr Pro Ile Met 1 5
45	<210> 37 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible	
50	<400> 37	Arg Gly Pro Ala 1
55		
60		

ES 2 912 932 T3

<210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia escindible
 <400> 38
 10
 Gly Gly Gln Pro Ser Gly Met Trp Gly Trp
 1 5 10
 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> secuencia escindible
 20
 <400> 39
 Phe Pro Arg Pro Leu Gly Ile Thr Gly Leu
 1 5 10
 25
 <210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> secuencia escindible
 <400> 40
 Val His Met Pro Leu Gly Phe Leu Gly Pro
 1 5 10
 35
 <210> 41
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> secuencia escindible
 45
 <400> 41
 Ser Pro Leu Thr Gly Arg Ser Gly
 1 5
 50
 <210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> secuencia escindible
 <400> 42
 Ser Ala Gly Phe Ser Leu Pro Ala
 1 5
 60
 <210> 43
 <211> 9

ES 2 912 932 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> secuencia escindible

 <400> 43

 Leu Ala Pro Leu Gly Leu Gln Arg Arg
 1 5
 10
 <210> 44
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> secuencia escindible

 <400> 44
 20
 Ser Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg
 1 5

 <210> 45
 <211> 4
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia escindible
 30
 <400> 45

 Pro Leu Gly Leu
 1
 35
 <210> 46
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> péptido espaciador

 <400> 46

 Gln Gly Gln Ser Gly Gln
 1 5
 45
 <210> 47
 <211> 8
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia de enlace escindible

 <400> 47
 55 Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly
 1 5

 <210> 48
 <211> 8
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 912 932 T3

<220>

<223> secuencia de enlace escindible

5 <400> 48

Pro Arg Phe Arg Ile Ile Gly Gly
1 5

<210> 49

10 $\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

15 <223> secuencia de enlace escindible

<400> 49

Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp
1 5

20 <210> 50

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 $\langle 220 \rangle$

$\langle 220 \rangle$

<223> secuencia de enlace escindible

<400> 50

30 Arg Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu
1 5 10

<210> 51

$\langle 211 \rangle$ 15

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de enlace escindible

40 <400> 51

<400> 51

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Lys Gly Asp Asp Ala
1 5 10 15

45 <210> 52
 <211> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> secuencia de enlace escindible

<400> 52

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Arg Gly Asp Asp Ala
1 5 10 15

55

<210> 53

$\leq 210 \geq 53$

 $\langle 210 \rangle$ 5.
 $\langle 211 \rangle$ 4.

$\langle 211 \rangle$ 4
 $\langle 212 \rangle$ DPT

<213> Secuencia artificial

60 $\langle 215 \rangle$
 $\langle 220 \rangle$

<220>

ES 2 912 932 T3

<223> secuencia de enlace escindible

<400> 53

Ile Glu Gly Arg
5 1

<210> 54

 $\langle 211 \rangle$ 4

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de enlace escindible

15 <400> 54

Ile Asp Gly Arg
1

<210> 55

20 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> secuencia de enlace escindible

<400> 55

Gly Gly Ser Ile Asp Gly Arg
1 5

30

<210> 56

$\langle 211 \rangle$ 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 $\langle 220 \rangle$

<223> secuencia de enlace escindible

<400> 56

40

Pro Leu Gly Leu Trp Ala
1 5

<210> 57

 $\langle 211 \rangle$ 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> secuencia de enlace escindible

<400> 57

Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln
1 5

55 <210> 58

$\langle 211 \rangle$ 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 $\langle 220 \rangle$

<223> secuencia de enlace escindible

ES 2 912 932 T3

<400> 58

5 Gly Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala
1 5

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia de enlace escindible

15 <400> 59

Gly Ile Ala Gly Gln
1 5

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia de enlace escindible

25 <400> 60

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Ile
1 5

30 <210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> secuencia de enlace escindible

<400> 61

40 Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly
1 5

<210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> secuencia de enlace escindible

50 <400> 62

Tyr Gly Ala Gly Leu Gly Val Val
1 5

55 <210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> secuencia de enlace escindible

ES 2 912 932 T3

<400> 63

Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Arg
1 5

5 <210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia de enlace escindible

<400> 64

Ala Gly Leu Gly Ile Ser Ser Thr
1 5

15 <210> 65
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia de enlace escindible

25 <400> 65

Glu Pro Gln Ala Leu Ala Met Ser
1 5

30 <210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> secuencia de enlace escindible

<400> 66

Gln Ala Leu Ala Met Ser Ala Ile
1 5

40 <210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> secuencia de enlace escindible

<400> 67

Ala Ala Tyr His Leu Val Ser Gln
1 5

50 <210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> secuencia de enlace escindible

60 <400> 68

ES 2 912 932 T3

		Met Asp Ala Phe Leu Glu Ser Ser
		1 5
5		<210> 69
		<211> 8
		<212> PRT
		<213> Secuencia artificial
10		<220>
		<223> secuencia de enlace escindible
		<400> 69
		Glu Ser Leu Pro Val Val Ala Val
		1 5
15		<210> 70
		<211> 8
		<212> PRT
		<213> Secuencia artificial
20		<220>
		<223> secuencia de enlace escindible
		<400> 70
		Ser Ala Pro Ala Val Glu Ser Glu
		1 5
25		<210> 71
		<211> 8
		<212> PRT
30		<213> Secuencia artificial
		<220>
		<223> secuencia de enlace escindible
35		<400> 71
		Asp Val Ala Gln Phe Val Leu Thr
		1 5
40		<210> 72
		<211> 8
		<212> PRT
		<213> Secuencia artificial
45		<220>
		<223> secuencia de enlace escindible
		<400> 72
		Val Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu
		1 5
50		<210> 73
		<211> 8
		<212> PRT
		<213> Secuencia artificial
55		<220>
		<223> secuencia de enlace escindible
60		<400> 73

ES 2 912 932 T3

	Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu Gly
	1 5
5	<210> 74 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> secuencia de enlace escindible <400> 74
	Pro Val Gln Pro Ile Gly Pro Gln
	1 5
15	<210> 75 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> fracción de enmascaramiento <400> 75
	Cys Ile Ser Pro Arg Gly
	1 5
25	<210> 76 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> fracción de enmascaramiento <400> 76
35	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Gly
	1 5
40	<210> 77 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
45	<220> <223> fracción de enmascaramiento <400> 77
	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly Pro Tyr Val Met Tyr
	1 5 10 15
50	<210> 78 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia artificial
55	<220> <223> fracción de enmascaramiento <400> 78
60	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly Pro Tyr Val Met
	1 5 10

<210> 79
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 10 <400> 79

 Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Glu Pro Gly Thr Tyr Val Pro Thr
 1 5 10 15

 <210> 80
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 80

 Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Gly Gln Ile Trp His Pro Pro
 1 5 10 15
 25
 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 81
 35
 Gly Ser His Cys Leu Ile Pro Ile Asn Met Gly Ala Pro Ser Cys
 1 5 10 15

 <210> 82
 <211> 32
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 45
 <400> 82

 Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Gly Gly Ser Ser Ala Ser Gln Ser Gly
 1 5 10 15

 Gln Gly Ser His Cys Leu Ile Pro Ile Asn Met Gly Ala Pro Ser Cys
 20 25 30
 50
 <210> 83
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 83

ES 2 912 932 T3

Cys Asn His His Tyr Phe Tyr Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
1 5 10 15

Cys Pro Gly

<210> 84

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 84

Ala Asp His Val Phe Trp Gly Ser Tyr Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
1 5 10 15

Cys Pro Gly

<210> 85

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 85

Cys His His Val Tyr Trp Gly His Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
1 5 10 15

Cys Pro Gly

<210> 86

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 86

Cys Pro His Phe Thr Thr Thr Ser Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
1 5 10 15

Cys Pro Gly

<210> 87

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 87

Cys Asn His His Tyr His Tyr Tyr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly

ES 2 912 932 T3

	1	5	10	15
	Cys Pro Gly			
	<210> 88			
	<211> 19			
	<212> PRT			
5	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> fracción de enmascaramiento			
10	<400> 88			
	Cys	Pro	His	Val
	1			
		Ser	Phe	Gly
		5		
			Ser	Cys
				10
			Gly	Cys
				Ile
			Ser	Pro
				Arg
				15
			Gly	
	Cys Pro Gly			
	<210> 89			
15	<211> 19			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
20	<223> fracción de enmascaramiento			
	<400> 89			
	Cys	Pro	Tyr	Tyr
	1			
		Thr	Leu	Ser
		5		
			Tyr	Cys
				10
			Gly	Cys
				Ile
			Ser	Pro
				Arg
				15
			Gly	
	Cys Pro Gly			
25	<210> 90			
	<211> 19			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
30	<220>			
	<223> fracción de enmascaramiento			
	<400> 90			
35	Cys	Asn	His	Val
	1			
		Tyr	Phe	Gly
		5		
			Thr	Cys
				10
			Gly	Cys
				Ile
			Ser	Pro
				Arg
				15
			Gly	
	Cys Pro Gly			
	<210> 91			
40	<211> 19			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
45	<223> fracción de enmascaramiento			
	<400> 91			
	Cys	Asn	His	Phe
	1			
		Thr	Leu	Thr
		5		
			Thr	Cys
				10
			Gly	Cys
				Ile
			Ser	Pro
				Arg
				15
			Gly	
	Cys Pro Gly			

<210> 92
 <211> 19
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 10 <400> 92

 Cys His His Phe Thr Leu Thr Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
 1 5 10 15

 Cys Pro Gly

 15 <210> 93
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 93

 Tyr Asn Pro Cys Ala Thr Pro Met Cys Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys
 1 5 10 15

 Pro Gly

 25 <210> 94
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 94

 35 Cys Asn His His Tyr Phe Tyr Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
 1 5 10 15

 Cys Gly

 40 <210> 95
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 95

 Cys Asn His His Tyr His Tyr Tyr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
 1 5 10 15

 50 Cys Gly

 <210> 96

ES 2 912 932 T3

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 96
 Cys Asn His Val Tyr Phe Gly Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
 1 5 10 15

Cys Gly

10

<210> 97
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 97

20

Cys His His Val Tyr Trp Gly His Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
 1 5 10 15

Cys Gly

<210> 98
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 98

Cys Pro His Phe Thr Thr Thr Ser Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
 1 5 10 15

Cys Gly

35

<210> 99
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 99

Cys Asn His Phe Thr Leu Thr Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
 1 5 10 15

Cys Gly

45

<210> 100
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 100

5

Cys His His Phe Thr Leu Thr Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
 1 5 10 15

Cys Gly

<210> 101

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

15

<400> 101

Cys Pro Tyr Tyr Thr Leu Ser Tyr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
 1 5 10 15

Cys Gly

20

<210> 102

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

30

<400> 102

Cys Pro His Val Ser Phe Gly Ser Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
 1 5 10 15

Cys Gly

<210> 103

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

40

<400> 103

Ala Asp His Val Phe Trp Gly Ser Tyr Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
 1 5 10 15

Cys Gly

45

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 104

Tyr	Asn	Pro	Cys	Ala	Thr	Pro	Met	Cys	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys
1				5					10					15	

Gly

5

<210> 105

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 105

15

Cys	His	His	Val	Tyr	Trp	Gly	His	Cys	Gly	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly
1				5					10					15	

Cys Gly

20

<210> 106

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

25

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MSC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser Asn o Pro

30

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MSC

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser His, Val o Phe

35

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MSC

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser Tyr o Thr

40

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MSC

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser Phe, Trp, Thr o Leu

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MSC

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser Tyr, Gly, Thr o Ser

50

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MSC

<222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser Thr, Ser, Tyr o His

55

<400> 106

ES 2 912 932 T3

Cys Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
1 5 10 15

Cys Gly

<210> 107
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fracción de enmascaramiento
<400> 107

Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Gly Gln Pro Ile Pro Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 108
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fracción de enmascaramiento
<400> 108

Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Thr Gln Pro Tyr His Val Ser Arg
1 5 10 15

<210> 109
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fracción de enmascaramiento
<400> 109

Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Asn Ala Val Ser Gly Leu Gly Ser
1 5 10 15

<210> 110
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fracción de enmascaramiento
<400> 110

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Gln Gln Gln Trp Cys Asn Ile Trp Ile
1 5 10 15

Asn Gly Gly Asp Cys Arg Gly Trp Asn Gly
20 25

<210> 111
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 111

5

Pro	Trp	Cys	Met	Gln	Arg	Gln	Asp	Phe	Leu	Arg	Cys	Pro	Gln	Pro
1				5					10					15

<210> 112

<211> 15

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

15

<400> 112

Gln	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Tyr	Met	Cys	Thr	Phe	Glu	Cys	Leu	Arg
1				5					10					15

20

<210> 113

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 113

Cys	Asn	Leu	Trp	Val	Ser	Gly	Gly	Asp	Cys	Gly	Gly	Leu	Gln	Gly
1				5					10					15

30

<210> 114

<211> 15

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

40

<400> 114

Ser	Cys	Ser	Leu	Trp	Thr	Ser	Gly	Ser	Cys	Leu	Pro	His	Ser	Pro
1				5					10					15

45

<210> 115

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

50

<400> 115

Tyr	Cys	Leu	Gln	Leu	Pro	His	Tyr	Met	Gln	Ala	Met	Cys	Gly	Arg
1				5					10					15

55

<210> 116

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 116

	Cys	Phe	Leu	Tyr	Ser	Cys	Thr	Asp	Val	Ser	Tyr	Trp	Asn	Asn	Thr
5	1				5					10					15

<210> 117

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

15 <400> 117

	Pro	Trp	Cys	Met	Gln	Arg	Gln	Asp	Tyr	Leu	Arg	Cys	Pro	Gln	Pro
	1				5					10					15

<210> 118

20 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 118

	Cys	Asn	Leu	Trp	Ile	Ser	Gly	Gly	Asp	Cys	Arg	Gly	Leu	Ala	Gly
30	1				5					10					15

<210> 119

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 119

40

	Cys	Asn	Leu	Trp	Val	Ser	Gly	Gly	Asp	Cys	Arg	Gly	Val	Gln	Gly
	1				5					10					15

<210> 120

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

50

<400> 120

	Cys	Asn	Leu	Trp	Val	Ser	Gly	Gly	Asp	Cys	Arg	Gly	Leu	Arg	Gly
	1				5					10					15

55

<210> 121

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

ES 2 912 932 T3

<400> 121

5 Cys Asn Leu Trp Ile Ser Gly Gly Asp Cys Arg Gly Leu Pro Gly
1 5 10 15

<210> 122
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

<400> 122

15 Cys Asn Leu Trp Val Ser Gly Gly Asp Cys Arg Asp Ala Pro Trp
1 5 10 15

<210> 123
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

25

<400> 123

Cys Asn Leu Trp Val Ser Gly Gly Asp Cys Arg Asp Leu Leu Gly
1 5 10 15

30

<210> 124
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

<400> 124

Cys Asn Leu Trp Val Ser Gly Gly Asp Cys Arg Gly Leu Gln Gly
1 5 10 15

40

<210> 125
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

50

<400> 125

Cys Asn Leu Trp Leu His Gly Gly Asp Cys Arg Gly Trp Gln Gly
1 5 10 15

55

<210> 126
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

ES 2 912 932 T3

<400> 126

	Cys	Asn	Ile	Trp	Leu	Val	Gly	Gly	Asp	Cys	Arg	Gly	Trp	Gln	Gly
	1				5					10					15

5 <210> 127
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 127

	Cys	Thr	Thr	Trp	Phe	Cys	Gly	Gly	Asp	Cys	Gly	Val	Met	Arg	Gly
	1				5					10					15

15 <210> 128
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

25 <400> 128

	Cys	Asn	Ile	Trp	Gly	Pro	Ser	Val	Asp	Cys	Gly	Ala	Leu	Leu	Gly
	1				5					10					15

30 <210> 129
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 129

	Cys	Asn	Ile	Trp	Val	Asn	Gly	Gly	Asp	Cys	Arg	Ser	Phe	Glu	Gly
	1				5					10					15

40 <210> 130
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 130

	Tyr	Cys	Leu	Asn	Leu	Pro	Arg	Tyr	Met	Gln	Asp	Met	Cys	Trp	Ala
	1				5					10					15

50 <210> 131
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

60 <400> 131

ES 2 912 932 T3

	Tyr	Cys	Leu	Ala	Leu	Pro	His	Tyr	Met	Gln	Ala	Asp	Cys	Ala	Arg
	1				5					10					15

5 <210> 132
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 132

	Cys	Phe	Leu	Tyr	Ser	Cys	Gly	Asp	Val	Ser	Tyr	Trp	Gly	Ser	Ala
	1				5					10					15

15 <210> 133
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 133

	Cys	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Cys	Thr	Asp	Ser	Ala	Phe	Trp	Asn	Asn	Arg
	1				5					10					15

25 <210> 134
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

35 <400> 134

	Cys	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Cys	Asn	Asp	Val	Ser	Tyr	Trp	Ser	Asn	Thr
	1				5					10					15

40 <210> 135
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 135

	Cys	Phe	Leu	Tyr	Ser	Cys	Thr	Asp	Val	Ser	Tyr	Trp
	1				5					10		

50 <210> 136
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 136

	Cys	Phe	Leu	Tyr	Ser	Cys	Thr	Asp	Val	Ala	Tyr	Trp	Asn	Ser	Ala
	1				5					10					15

60

<210> 137
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 10 <400> 137

 Cys Phe Leu Tyr Ser Cys Thr Asp Val Ser Tyr Trp Gly Asp Thr
 1 5 10 15

 15 <210> 138
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 138

 Cys Phe Leu Tyr Ser Cys Thr Asp Val Ser Tyr Trp Gly Asn Ser
 1 5 10 15
 25 <210> 139
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 139

 Cys Phe Leu Tyr Ser Cys Thr Asp Val Ala Tyr Trp Asn Asn Thr
 1 5 10 15
 35 <210> 140
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 140
 45 <210> 141
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 55 <400> 141

 Cys Phe Leu Tyr Ser Cys Thr Asp Val Ala Tyr Trp Ser Gly Leu
 1 5 10 15

 Leu Ser

ES 2 912 932 T3

<210> 142
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 142
 10
 Cys Tyr Leu Tyr Ser Cys Thr Asp Gly Ser Tyr Trp Asn Ser Thr
 1 5 10 15
 <210> 143
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 20
 <400> 143
 Cys Phe Leu Tyr Ser Cys Ser Asp Val Ser Tyr Trp Gly Asn Ile
 1 5 10 15
 <210> 144
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 30
 <400> 144
 Cys Phe Leu Tyr Ser Cys Thr Asp Val Ala Tyr Trp
 1 5 10
 35
 <210> 145
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 145
 45
 Cys Phe Leu Tyr Ser Cys Thr Asp Val Ser Tyr Trp Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 <210> 146
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 55
 <400> 146
 Cys Phe Leu Tyr Ser Cys Thr Asp Val Ala Tyr Trp Gly Asp Thr
 60
 1 5 10 15
 <210> 147

<211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 147

Gly Cys Asn Ile Trp Leu Asn Gly Gly Asp Cys Arg Gly Trp Val Asp
 1 5 10 15

10 Pro Leu Gln Gly
 20

<210> 148
 <211> 20
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

20 <400> 148

Gly Cys Asn Ile Trp Leu Val Gly Gly Asp Cys Arg Gly Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Asn Gly
 20

25 <210> 149
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 149

Gly Cys Asn Ile Trp Leu Val Gly Gly Asp Cys Arg Gly Trp Ile Glu
 1 5 10 15

Asp Ser Asn Gly
 20

35 <210> 150
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 150

45 Gly Cys Asn Ile Trp Ala Asn Gly Gly Asp Cys Arg Gly Trp Ile Asp
 1 5 10 15

Asn Ile Asp Gly
 20

<210> 151

<211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 151

	Gly	Cys	Asn	Ile	Trp	Leu	Val	Gly	Gly	Asp	Cys	Arg	Gly	Trp	Leu	Gly
	1				5					10					15	

10

	Glu	Ala	Val	Gly
				20

<210> 152
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

20

<400> 152

	Gly	Cys	Asn	Ile	Trp	Leu	Val	Gly	Gly	Asp	Cys	Arg	Gly	Trp	Leu	Glu
	1				5					10					15	

25

	Glu	Ala	Val	Gly
				20

<210> 153
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 153

	Gly	Gly	Pro	Ala	Leu	Cys	Asn	Ile	Trp	Leu	Asn	Gly	Gly	Asp	Cys	Arg
	1				5					10					15	

35

	Gly	Trp	Ser	Gly
				20

40

<210> 154
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 154

ES 2 912 932 T3

Gly Ala Pro Val Phe Cys Asn Ile Trp Leu Asn Gly Gly Asp Cys Arg
1 5 10 15

Gly Trp Met Gly
20

<210> 155

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 155

Gly Gln Gln Gln Trp Cys Asn Ile Trp Ile Asn Gly Gly Asp Cys Arg
1 5 10 15

Gly Trp Asn Gly
20

<210> 156

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 156

Gly Lys Ser Glu Phe Cys Asn Ile Trp Leu Asn Gly Gly Asp Cys Arg
1 5 10 15

Gly Trp Ile Gly
20

<210> 157

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 157

Gly Thr Pro Gly Gly Cys Asn Ile Trp Ala Asn Gly Gly Asp Cys Arg
1 5 10 15

Gly Trp Glu Gly
20

<210> 158

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 158

ç

ES 2 912 932 T3

Gly Ala Ser Gln Tyr Cys Asn Leu Trp Ile Asn Gly Gly Asp Cys Arg
1 5 10 15

Gly Trp Arg Gly
20

<210> 159

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 159

Gly Cys Asn Ile Trp Leu Val Gly Gly Asp Cys Arg Pro Trp Val Glu
1 5 10 15

Gly Gly

<210> 160

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 160

Gly Cys Asn Ile Trp Ala Val Gly Gly Asp Cys Arg Pro Phe Val Asp
1 5 10 15

Gly Gly

<210> 161

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 161

Gly Cys Asn Ile Trp Leu Asn Gly Gly Asp Cys Arg Ala Trp Val Asp
1 5 10 15

Thr Gly

<210> 162

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 162

ES 2 912 932 T3

Gly Cys Asn Ile Trp Ile Val Gly Gly Asp Cys Arg Pro Phe Ile Asn
1 5 10 15

Asp Gly

<210> 163
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> fracción de enmascaramiento

<400> 163

Gly Cys Asn Ile Trp Leu Asn Gly Gly Asp Cys Arg Pro Val Val Phe
1 5 10 15

Gly Gly

<210> 164
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

<400> 164

Gly Cys Asn Ile Trp Leu Ser Gly Gly Asp Cys Arg Met Phe Met Asn
1 5 10 15

Glu Gly

<210> 165
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

<400> 165

Gly Cys Asn Ile Trp Val Asn Gly Gly Asp Cys Arg Ser Phe Val Tyr
1 5 10 15

Ser Gly

<210> 166
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

<400> 166

Gly Cys Asn Ile Trp Leu Asn Gly Gly Asp Cys Arg Gly Trp Glu Ala
1 5 10 15

Ser Gly

<210> 167

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 167

Gly Cys Asn Ile Trp Ala His Gly Gly Asp Cys Arg Gly Phe Ile Glu
1 5 10 15

Pro Gly

<210> 168

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 168

Gly Cys Asn Ile Trp Leu Asn Gly Gly Asp Cys Arg Thr Phe Val Ala
1 5 10 15

Ser Gly

<210> 169

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 169

Gly Cys Asn Ile Trp Ala His Gly Gly Asp Cys Arg Gly Phe Ile Glu
1 5 10 15

Pro Gly

<210> 170

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 170

Gly Phe Leu Glu Asn Cys Asn Ile Trp Leu Asn Gly Gly Asp Cys Arg
1 5 10 15

Thr Gly

<210> 171
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 171
 Gly Ile Tyr Glu Asn Cys Asn Ile Trp Leu Asn Gly Gly Asp Cys Arg
 1 5 10 15
 10 Met Gly
 <210> 172
 <211> 18
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 20 <400> 172
 Gly Ile Pro Asp Asn Cys Asn Ile Trp Ile Asn Gly Gly Asp Cys Arg
 1 5 10 15
 Tyr Gly
 25 <210> 173
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 173
 Arg Glu Cys Gly Arg Cys Gly Asp Ile Pro Phe Pro Ala His Trp Val
 1 5 10 15
 Pro Arg Thr
 35 <210> 174
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 174
 45 Gln Gly Gln Ser Gly Gln Tyr Gly Ser Cys Ser Trp Asn Tyr Val His
 1 5 10 15
 Ile Phe Met Asp Cys

<210> 175
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 175
 10
 Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Asp Phe Asp Ile Pro Phe Pro Ala His
 1 5 10 15
 Trp Val Pro Ile Thr
 20
 <210> 176
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 20
 <400> 176
 Gln Gly Gln Ser Gly Gln Met Gly Val Pro Ala Gly Cys Val Trp Asn
 1 5 10 15
 Tyr Ala His Ile Phe Met Asp Cys
 20
 <210> 177
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 30
 <400> 177
 Tyr Arg Ser Cys Asn Trp Asn Tyr Val Ser Ile Phe Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 <210> 178
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 45
 <400> 178
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Pro Phe Pro Ala His Trp Val Pro Asn Thr
 1 5 10 15
 <210> 179
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 55

ES 2 912 932 T3

<400> 179

5 Glu Ser Ser Cys Val Trp Asn Tyr Val His Ile Tyr Met Asp Cys
 1 5 10 15

<210> 180
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

<400> 180

15 Tyr Pro Gly Cys Lys Trp Asn Tyr Asp Arg Ile Phe Leu Asp Cys
 1 5 10 15

<210> 181
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

25

<400> 181

 Tyr Arg Thr Cys Ser Trp Asn Tyr Val Gly Ile Phe Leu Asp Cys
 1 5 10 15

30

<210> 182
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

<400> 182

40 Tyr Gly Ser Cys Ser Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Met Asp Cys
 1 5 10 15

<210> 183
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

50

<400> 183

 Tyr Gly Ser Cys Ser Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Leu Asp Cys
 1 5 10 15

<210> 184
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

60

<400> 184

ES 2 912 932 T3

		Tyr	Gly	Ser	Cys	Asn	Trp	Asn	Tyr	Val	His	Ile	Phe	Leu	Asp	Cys
		1				5					10					15

5

<210> 185
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 185

		Tyr	Thr	Ser	Cys	Asn	Trp	Asn	Tyr	Val	His	Ile	Phe	Met	Asp	Cys
		1				5					10					15

15

<210> 186
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 186

25

		Tyr	Pro	Gly	Cys	Lys	Trp	Asn	Tyr	Asp	Arg	Ile	Phe	Leu	Asp	Cys
		1				5					10					15

<210> 187
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 187

35

		Trp	Arg	Ser	Cys	Asn	Trp	Asn	Tyr	Ala	His	Ile	Phe	Leu	Asp	Cys
		1				5					10					15

<210> 188
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 188

45

		Trp	Ser	Asn	Cys	His	Trp	Asn	Tyr	Val	His	Ile	Phe	Leu	Asp	Cys
		1				5					10					15

50

<210> 189
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 189

60

ES 2 912 932 T3

	Asp Arg Ser Cys Thr Trp Asn Tyr Val Arg Ile Ser Tyr Asp Cys	1 5 10 15
5	<210> 190 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> fracción de enmascaramiento	
	<400> 190	
	Ser Gly Ser Cys Lys Trp Asp Tyr Val His Ile Phe Leu Asp Cys	1 5 10 15
15	<210> 191 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> fracción de enmascaramiento	
	<400> 191	
25	Ser Arg Ser Cys Ile Trp Asn Tyr Ala His Ile His Leu Asp Cys	1 5 10 15
30	<210> 192 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> fracción de enmascaramiento	
	<400> 192	
	Ser Met Ser Cys Tyr Trp Gln Tyr Glu Arg Ile Phe Leu Asp Cys	1 5 10 15
40	<210> 193 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> fracción de enmascaramiento	
	<400> 193	
	Tyr Arg Ser Cys Asn Trp Asn Tyr Val Ser Ile Phe Leu Asp Cys	1 5 10 15
50	<210> 194 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> fracción de enmascaramiento	
	<400> 194	
60	Tyr Gly Ser Cys Ser Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Met Asp Cys	1 5 10 15

ES 2 912 932 T3

5 <210> 195
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 10 <400> 195

 Ser Gly Ser Cys Lys Trp Asp Tyr Val His Ile Phe Leu Asp Cys
 1 5 10 15

 15 <210> 196
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 196

 Tyr Lys Ser Cys His Trp Asp Tyr Val His Ile Phe Leu Asp Cys
 1 5 10 15

 25 <210> 197
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 197

 35 Tyr Gly Ser Cys Thr Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Met Glu Cys
 1 5 10 15

 40 <210> 198
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 198

 Phe Ser Ser Cys Asn Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Leu Asp Cys
 1 5 10 15

 50 <210> 199
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 199

 Trp Arg Ser Cys Asn Trp Asn Tyr Ala His Ile Phe Leu Asp Cys
 1 5 10 15

<210> 200
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 200
 10
 Tyr Gly Ser Cys Gln Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 <210> 201
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 20
 <400> 201
 Tyr Arg Ser Cys Asn Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 25
 <210> 202
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 202
 Asn Met Ser Cys His Trp Asp Tyr Val His Ile Phe Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 35
 <210> 203
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 45
 <400> 203
 Phe Gly Pro Cys Thr Trp Asn Tyr Ala Arg Ile Ser Trp Asp Cys
 1 5 10 15
 50
 <210> 204
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <220>
 <221> característica_msc
 <222> (1)..(2)
 60
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 <220>

<221> característica_msc
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

5 <220>
 <221> característica_msc
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

10 <220>
 <221> característica_msc
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

15 <400> 204

	Xaa	Xaa	Ser	Cys	Xaa	Trp	Xaa	Tyr	Val	His	Ile	Phe	Xaa	Asp	Cys
	1				5					10					15

<210> 205
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

25 <400> 205

	Met	Gly	Val	Pro	Ala	Gly	Cys	Val	Trp	Asn	Tyr	Ala	His	Ile	Phe	Met
	1				5					10					15	

Asp Cys

30 <210> 206
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

40 <400> 206

	Arg	Asp	Thr	Gly	Gly	Gln	Cys	Arg	Trp	Asp	Tyr	Val	His	Ile	Phe	Met
	1				5					10					15	

Asp Cys

45 <210> 207
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 207

	Ala	Gly	Val	Pro	Ala	Gly	Cys	Thr	Trp	Asn	Tyr	Val	His	Ile	Phe	Met
	1				5					10					15	

Glu Cys

ES 2 912 932 T3

<210> 208
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 208
 10
 Val Gly Val Pro Asn Gly Cys Val Trp Asn Tyr Ala His Ile Phe Met
 1 5 10 15
 Glu Cys
 <210> 209
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 20
 <400> 209
 Asp Gly Gly Pro Ala Gly Cys Ser Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Met
 1 5 10 15
 Glu Cys
 25
 <210> 210
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 210
 Ala Val Gly Pro Ala Gly Cys Trp Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Met
 1 5 10 15
 Glu Cys
 35
 <210> 211
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 45
 <400> 211
 Cys Thr Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Met Asp Cys Gly Glu Gly Glu
 1 5 10 15
 Gly Pro
 50
 <210> 212
 <211> 18
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 5
 <400> 212
 Gly Gly Val Pro Glu Gly Cys Thr Trp Asn Tyr Ala His Ile Phe Met
 1 5 10 15
 Glu Cys
 10
 <210> 213
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 213
 Ala Glu Val Pro Ala Gly Cys Trp Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Met
 1 5 10 15
 Glu Cys
 20
 <210> 214
 <211> 18
 <212> PRT
 25
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 30
 <400> 214
 Ala Gly Val Pro Ala Gly Cys Thr Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Met
 1 5 10 15
 Glu Cys
 35
 <210> 215
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 215
 Ser Gly Ala Ser Gly Gly Cys Lys Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Met
 1 5 10 15
 Asp Cys
 45
 <210> 216
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 216

Met Gly Val Pro Ala Gly Cys Val Trp Asn Tyr Ala His Ile Phe Met
1 5 10 15

5 Asp Cys

<210> 217

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

15 <400> 217

Thr Pro Gly Cys Arg Trp Asn Tyr Val His Ile Phe Met Glu Cys Glu
1 5 10 15

Ala Leu

<210> 218

<211> 18

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 218

Val Gly Val Pro Asn Gly Cys Val Trp Asn Tyr Ala His Ile Phe Met
1 5 10 15

Glu Cys

30

<210> 219

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 219

40

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Pro Phe Pro Ala His Trp Val Pro Asn Thr
1 5 10 15

<210> 220

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

50

<400> 220

Arg Gly Ala Cys Asp Ile Pro Phe Pro Ala His Trp Ile Pro Asn Thr
1 5 10 15

5 <210> 221
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 10 <400> 221

 Gln Gly Asp Phe Asp Ile Pro Phe Pro Ala His Trp Val Pro Ile Thr
 1 5 10 15
 <210> 222
 <211> 16
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MSC
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 25 <400> 222

 Xaa Gly Ala Phe Asp Ile Pro Phe Pro Ala His Trp Val Pro Asn Thr
 1 5 10 15

 30 <210> 223
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 223

 Arg Gly Asp Gly Asn Asp Ser Asp Ile Pro Phe Pro Ala His Trp Val
 1 5 10 15

 40 Pro Arg Thr

 <210> 224
 <211> 19
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 50 <400> 224

 Ser Gly Val Gly Arg Asp Arg Asp Ile Pro Phe Pro Ala His Trp Val
 1 5 10 15

 Pro Arg Thr

 55 <210> 225
 <211> 19
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

5

<400> 225

Trp	Ala	Gly	Gly	Asn	Asp	Cys	Asp	Ile	Pro	Phe	Pro	Ala	His	Trp	Ile
1				5					10					15	

Pro Asn Thr

10

<210> 226

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 226

Trp	Gly	Asp	Gly	Met	Asp	Val	Asp	Ile	Pro	Phe	Pro	Ala	His	Trp	Val
1				5					10					15	

Pro Val Thr

20

<210> 227

<211> 19

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

30

<400> 227

Ala	Gly	Ser	Gly	Asn	Asp	Ser	Asp	Ile	Pro	Phe	Pro	Ala	His	Trp	Val
1				5					10					15	

Pro Arg Thr

35

<210> 228

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 228

Glu	Ser	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ile	Pro	Phe	Pro	Ala	His	Trp	Val
1				5					10					15	

Pro Arg Thr

45

<210> 229

<211> 819

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Anticuerpo CTLA-4 scFv Antihumano

<400> 229

```

ggaggtggat ctggaggtgg cggttcaggc tctggcggag gctcaggtgg tggaggatca      60
ggcggaggtg aaattgtgtt gacacagtct ccaggcaccg tgtctttgtc tccaggggaa      120
agagccaccg tctcctgcag ggccagtcag agtggttagca gcagctactt agcctggtac      180
cagcagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcatctatg gtgcattccag cagggccact      240
ggcatcccag acaggttcag tggcagtggt tctgggacag acttcactct caccatcagc      300
agactggagc ctgaagattt tgcagtgtat tactgtcagc agtatggtag ctcaccgctc      360
actttcggcg gagggaccaa ggtggaaatc aaacgttccg gagggtcgac cataacttcg      420
tataatgtat actatacgaa gttatcctcg agcggtagcc aggtgcagct ggtgcagact      480
gggggaggcg tgggccagcc tgggaggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggatcc      540
acctttagca gctatgccat gagctgggtc cgccaggctc caggaagggt gctggagtgg      600
gtctcagcta ttagtggttag tggtggttag acatactacg cagactccgt gaagggccgg      660
ttcaccatct ccagagacaa ttccaagaac acgctgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga      720
gccgaggaca cggccgtata ttactgtgcg acaaactccc tttactggta cttcgatctc      780
tggggccgtg gcaccctggt cactgtctct tcagctagc      819

```

5

<210> 230

<211> 273

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Anticuerpo CTLA-4 scFv Antihumano

<400> 230

15

```

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
1          5          10          15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly
20          25          30

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
35          40          45

Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50          55          60

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
65          70          75          80

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85          90          95

```

ES 2 912 932 T3

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr
130 135 140

Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln Val Gln Leu Val Gln Thr
145 150 155 160

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
165 170 175

Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln
180 185 190

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
210 215 220

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
225 230 235 240

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Ser Leu Tyr Trp
245 250 255

Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
260 265 270

Ser

<210> 231

<211> 792

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo CD3 epsilon OKT3 scFv Antihumano

<400> 231

ggaggtggat ctggaggtgg cggttcaggc tctggcggag gctcaggtgg tggaggatca 60

ggcggaggtc aggttcagct gcagcagagc ggtgcagaac tggcacgtcc ggggtgaagc 120

gttaaaatga gctgtaaagc aagcggttat acctttaccc gttataccat gcattggggtt 180

ES 2 912 932 T3

```

aaacagcgtc cgggtcaggg tctggaatgg attggttata tcaatccgag ccgtggttat    240
accaactaca accagaaatt caaagataaa gcaaccctga ccaccgataa aagcagcagc    300
accgcctata tgcagctgag cagcctgacc tcagaggata gcgcagttta ttactgtgca    360
cgctattatg atgatcacta ttgcctggat tattgggggtc agggcaccac cctgaccgtt    420
agcagcgggtg gtggtggttag tgggtggcggg ggttcaggcg gtggcggtag ccagattgtt    480
ctgacccaga gtccggcaat tatgagcgca agtccgggtg aaaaagttac catgacctgt    540
agcgccagca gcagcggttag ctatatgaat tggatcagc agaaaagcgg caccagcccg    600
aaacgttgga tttatgatac cagcaaactg gcaagcgggtg ttccggcaca ttttcgtggt    660
agcggtagcg gcacctcata tagcctgacc attagcggta tgggaagcaga agatgcagca    720
acctattatt gtcagcagtg gtcaagcaat ccgtttacct ttggtagtgg caccaaactg    780
gaaattaatc gt                                                    792

```

<210> 232

<211> 264

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo CD3 epsilon OKT3 scFv Antihumano

<400> 232

```

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
1          5          10          15

```

```

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
20          25          30

```

```

Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
35          40          45

```

```

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
50          55          60

```

```

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
65          70          75          80

```

```

Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
85          90          95

```

```

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
100         105         110

```

```

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys

```

ES 2 912 932 T3

115	120	125
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly		
130	135	140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val		
145	150	155 160
Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val		
	165	170 175
Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr		
	180	185 190
Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser		
	195	200 205
Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly		
	210	215 220
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala		
	225	230 235 240
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser		
	245	250 255
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg		
	260	

<210> 233

<211> 1347

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo de cadena pesada 4D11v2 Antihumano conjugado

<400> 233

gaggtgcacc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct	120
ccaggaagg ggctggagt ggtgtcaagt attgaccggc aaggtcggca gacatattac	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacatc	300
ggcggcaggc cggcctttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctcctcagct	360
agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg	480

ES 2 912 932 T3

```

aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtcctaca gtctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa gcaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gcaaaggggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct cctgtctccc gggtaaa 1347

```

<210> 234

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo de cadena pesada 4D11v2 Antihumano conjugado

<400> 234

```

Glu Val His Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

```

```

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

```

```

Ser Ser Ile Asp Pro Glu Gly Arg Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

```

```

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

```

ES 2 912 932 T3

85								90				95			
Ala	Lys	Asp	Ile	Gly	Gly	Arg	Ser	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115					120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
	130					135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155					160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
	210					215					220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245				250						255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290					295					300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310				315						320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				325				330						335	

ES 2 912 932 T3

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 235

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo de cadena ligera 4D11v2 Antihumano conjugado

<220>

<221> característica_miac

<222> (545)..(545)

<223> n puede ser cualquier aminoácido

<400> 235

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgcg gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggtatc tgggacagat ttactctcca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag acggttgtgg cgctccggtt attcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgancaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 236

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo de cadena ligera 4D11v2 Antihumano conjugado

<220>

<221> característica_miac

<222> (182)..(182)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 236

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Val Val Ala Pro Pro
 85 90 95

Leu Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Xaa Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 237

<211> 1347

<212> ADN

ES 2 912 932 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo de cadena pesada conjugado Antihumano 4D11

5

<400> 237

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct	120
ccaggaagg ggctggagt ggtgtcaagt attgaccgg aaggtcggca gacatattac	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacatc	300
ggcggcaggc cggcctttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctcctcagct	360
agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gacctcag	780
gtcacatgcg tgggtggtga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac	840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960
tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa	1020
gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacacctgc ccccatcccg ggaggagatg	1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc	1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1320
aagagcctct cctgtctcc gggtaaa	1347

10

<210> 238

<211> 449

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo de cadena pesada conjugado Antihumano 4D11

20

<400> 238

ES 2 912 932 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ser	Ser	Ile	Asp	Pro	Glu	Gly	Arg	Gln	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Lys	Asp	Ile	Gly	Gly	Arg	Ser	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	

ES 2 912 932 T3

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 239

<211> 774

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo activable anti-jagged5342-1204-4D11v2

5

<400> 239

```

caagggccagt ctggccagtg caatatttgg ctcgtaggtg gtgattgcag gggctggcag      60
gggggctcga gcggtggcag cgggtggctct ggtggtctga gcggccgttc cgataatcat      120
ggcggcggtt ctgacatcca gatgaccag tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga      180
gacagagtca ccatcacttg ccgggcaagt cagagcatta gcagctattt aaattggtat      240
cagcagaaac cagggaaagc ccctaagctc ctgatctatg cggcatccag tttgcaaagt      300
ggggtcccat caaggttcag tggcagtga tctgggacag atttcaactct caccatcagc      360
agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcaac agacggttgt ggcgcctccg      420
ttattcggcc aagggaacaa ggtggaaatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc      480
atcttcccg ccatctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg      540
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg      600
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc      660
agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc      720
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt          774

```

<210> 240

<211> 258

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo activable anti-jagged5342-1204-4D11v2

15

<220>

<221> característica_miac

<222> (226)..(226)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

20

<400> 240

ES 2 912 932 T3

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Asn Ile Trp Leu Val Gly Gly Asp Cys
 1 5 10 15
 Arg Gly Trp Gln Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 35 40 45
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 50 55 60
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr
 65 70 75 80
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser
 85 90 95
 Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 100 105 110
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 115 120 125
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Val Val Ala Pro Pro Leu Phe Gly Gln
 130 135 140
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 145 150 155 160
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 165 170 175
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 180 185 190
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 195 200 205
 Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 210 215 220
 Leu Xaa Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 225 230 235 240
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 245 250 255

Glu Cys

<210> 241

<211> 2139

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo multiespecifico anti-jagged4D11v2 anti CD3 OKT3

<400> 241

gaggtgcacc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc ttagctgggt ccgccaggt	120
ccaggaagg ggtcggagt ggtgtcaagt attgaccgg aaggtcggca gacatattac	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacatc	300
ggcggcaggt cggcctttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctcagct	360
agcaccaagg gcccatcgtt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagccaaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag	780
gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactgttac	840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa	1020
gccaaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg	1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc	1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgctctg	1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagga ggtggatctg gaggtggcgg ttcaggctct	1380
ggcggaggct caggtggtgg aggatcaggc ggaggtcagg ttcagctgca gcagagcggg	1440

ES 2 912 932 T3

```
gcagaactgg cacgtccggg tgcaagcgtt aaaatgagct gtaaagcaag cggttataacc 1500
tttaccocgtt ataccatgca ttgggttaaa cagcgtccgg gtcagggctct ggaatggatt 1560
ggttatatca atccgagccg tggttataacc aactacaacc agaaattcaa agataaagca 1620
accctgacca ccgataaaag cagcagcacc gcctatatgc agctgagcag cctgacctca 1680
gaggatagcg cagtttatta ctgtgcacgc tattatgatg atcactattg cctggattat 1740
tggggtcagg gcaccaccct gaccgttagc agcggtggtg gtggtagtgg tggcggtggt 1800
tcaggcggtg gcggtagcca gattgttctg acccagagtc cggcaattat gagcgcaagt 1860
ccgggtgaaa aagttacat gacctgtagc gccagcagca gcgttagcta tatgaattgg 1920
tatcagcaga aaagcggcac cagcccgaaa cgttggattt atgataccag caaactggca 1980
agcggtggtc cggcacattt tcgtggtagc ggtagcggca cctcatatag cctgaccatt 2040
agcggtatgg aagcagaaga tgcagcaacc tattattgtc agcagtggtc aagcaatccg 2100
tttacctttg gtagtggcac caaactggaa attaatcgt 2139
```

<210> 242

<211> 713

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo multiespecifico anti-jagged4D11v2 anti CD3 OKT3

<400> 242

```
Glu Val His Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
```

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30
```

```
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
```

```
Ser Ser Ile Asp Pro Glu Gly Arg Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
```

```
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
```

```
Ala Lys Asp Ile Gly Gly Arg Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100         105         110
```


ES 2 912 932 T3

Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	290	295	300
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	305	310	315
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	325	330	335
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	340	345	350
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	355	360	365

ES 2 912 932 T3

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
 465 470 475 480
 Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala
 485 490 495
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg
 500 505 510
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly
 515 520 525
 Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr
 530 535 540
 Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 545 550 555 560
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr
 565 570 575
 Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly
 580 585 590
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile
 595 600 605
 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys

ES 2 912 932 T3

610

615

620

Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp
625 630 635 640

Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr
645 650 655

Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser
660 665 670

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala
675 680 685

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly
690 695 700

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
705 710

<210> 243

<211> 1434

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo multiespecífico anti-jagged4D11v2 anti CD3 OKT3

<220>

<221> característica_miac

<222> (545)..(545)

<223> n puede ser cualquier aminoácido

<400> 243

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgcg gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag acggttgtgg cgctccgtt attcggccaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgancaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600

ES 2 912 932 T3

```

ctgagctcgc cgcgcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtggaggtgg atctggaggt      660
ggcggttcag gctctggcgg aggcctcaggt ggtggaggat caggcggagg tcaggttcag      720
ctgcagcaga gcggtgcaga actggcacgt ccgggtgcaa gcgttaaaat gagctgtaaa      780
gcaagcgggtt atacctttac ccgttatacc atgcattggg ttaaacagcg tccgggtcag      840
ggtctggaat ggattggtta tatcaatccg agccgtggtt ataccaacta caaccagaaa      900
ttcaaagata aagcaaccct gaccaccgat aaaagcagca gcaccgccta tatgcagctg      960
agcagcctga cctcagagga tagcgcagtt tattactgtg cacgctatta tgatgatcac     1020
tattgcctgg attattgggg tcagggcacc accctgaccg ttagcagcgg tgggtggtgg      1080
agtgggtggcg gtggttcagg cgggtggcgg agccagattg ttctgacca gagtccggca     1140
attatgagcg caagtccggg tgaaaaagtt accatgacct gtagcgccag cagcagcgtt     1200
agctatatga attggtatca gcagaaaagc ggcaccagcc cgaaacgttg gatttatgat     1260
accagcaaac tggcaagcgg tggtccggca cattttcgtg gtagcggtag cggcacctca     1320
tatagcctga ccattagcgg tatggaagca gaagatgcag caacctatta ttgtcagcag     1380
tggtcaagca atccggtttac ctttggtagt ggcaccaaac tggaaattaa tcgt          1434

```

<210> 244

<211> 478

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo multiespecífico anti-jagged4D11v2 anti CD3 OKT3

<220>

<221> característica_miac

<222> (182)..(182)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 244

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

```

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

```

```

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

```

```

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

```

```

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

```

ES 2 912 932 T3

65					70											75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Val	Val	Ala	Pro	Pro						
				85					90					95							
Leu	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala						
			100					105					110								
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly						
		115					120					125									
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala						
	130					135					140										
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln						
145					150					155					160						
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser						
				165					170					175							
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Xaa	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr						
			180					185					190								
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser						
		195					200					205									
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly						
	210					215					220										
Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln						
225					230					235					240						
Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys						
				245					250					255							
Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His						
			260					265					270								
Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile						
		275					280					285									
Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys						
	290					295					300										
Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu						
305					310					315				320							

ES 2 912 932 T3

Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr
325 330 335

Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
340 345 350

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala
370 375 380

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
385 390 395 400

Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg
405 410 415

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe
420 425 430

Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met
435 440 445

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
450 455 460

Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
465 470 475

<210> 245

<211> 1566

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de Anticuerpo activable multiespecífico 5342-1204-4D11v2-CD3 OKT3 anti-jaggedanti CD3

<220>

<221> característica_msc

<222> (677)..(677)

<223> n puede ser cualquier aminoácido

<400> 245

caagggcagct ctggccagtg caatatttgg ctcgtaggtg gtgattgcag gggctggcag 60

gggggctcga gcggtggcag cggtggctct ggtggctctga gcggccgttc cgataatcat 120

ggcggcggtt ctgacatcca gatgaccag tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga 180

gacagagtca ccatcacttg ccgggcaagt cagagcatta gcagctattt aaattggtat 240

ES 2 912 932 T3

```

cagcagaaac cagggaaagc ccctaagctc ctgatctatg cggcatccag ttgcaaagt      300
gggggtcccat caaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcactct caccatcagc      360
agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcaac agacggttgt ggcgcctccg      420
ttattcggcc aagggaccaa ggtggaaatc aaacgtacgg tggtgcacc atctgtcttc      480
atcttcccg cactctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg      540
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaggg tggataacgc cctccaatcg      600
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc      660
agcaccctga cgctgancaa agcagactac gagaacacaa aagtctacgc ctgcgaagtc      720
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtggaggt      780
ggatctggag gtggcgggtc aggtctctggc ggaggtcag gtggtggagg atcaggcggg      840
ggtcaggttc agctgcagca gagcgggtga gaactggcac gtccgggtgc aagcgtaaa      900
atgagctgta aagcaagcgg ttataccttt acccggtata ccatgcattg ggttaaacag      960
cgtccgggtc aggggtctgga atggattggt tatatcaatc cgagccgtgg ttataccaac     1020
tacaaccaga aattcaaaga taaagcaacc ctgaccaccg ataaaagcag cagcaccgcc     1080
tatatgcagc tgagcagcct gacctcagag gatagcgcag tttattactg tgcacgctat     1140
tatgatgata actattgcct ggattattgg ggtcagggca ccacctgac cgttagcagc     1200
ggtggtggtg gtagtggtgg cgggtggtca ggcggtggcg gtagccagat tgttctgacc     1260
cagagtcagg caattatgag cgcaagtcgg ggtgaaaaag ttacatgac ctgtagcgcc     1320
agcagcagcg ttagctatat gaattggtat cagcagaaaa gcggcaccag cccgaaacgt     1380
tggatttatg ataccagcaa actggcaagc ggtgttccgg cacattttcg tggtagcggg     1440
agcggcacct catatagcct gaccattagc ggtatggaag cagaagatgc agcaacctat     1500
tattgtcagc agtgggtcaag caatccgttt acctttggta gtggcaccaa actggaattt     1560
aatcgt                                           1566

```

<210> 246

<211> 522

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de Anticuerpo activable multiespecífico 5342-1204-4D11v2-CD3 OKT3 anti-jaggedanti CD3

<220>

<221> característica_msc

<222> (226)..(226)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 246

ES 2 912 932 T3

Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Asn	Ile	Trp	Leu	Val	Gly	Gly	Asp	Cys	1	5	10	15
Arg	Gly	Trp	Gln	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	20	25	30	
Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	His	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	35	40	45	
Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	50	55	60	
Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	65	70	75	80
Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	85	90	95	
Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	100	105	110	
Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	115	120	125	
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Val	Val	Ala	Pro	Pro	Leu	Phe	Gly	Gln	130	135	140	
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	145	150	155	160
Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	165	170	175	
Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	180	185	190	
Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	195	200	205	
Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	210	215	220	
Leu	Xaa	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	225	230	235	240
Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly				

ES 2 912 932 T3

245										250					255				
Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly				
		260						265						270					
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser				
		275						280					285						
Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys				
	290						295					300							
Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln				
305					310					315					320				
Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg				
				325					330						335				
Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr				
			340					345						350					
Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr				
		355					360						365						
Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His				
	370						375					380							
Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser				
385					390					395					400				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln				
				405					410						415				
Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu				
			420					425						430					
Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn				
		435					440						445						
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp				
	450					455					460								
Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	His	Phe	Arg	Gly	Ser	Gly				
465					470					475					480				
Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Asp				
			485						490					495					
Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	Phe				
			500					505						510					
Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Asn	Arg										
		515						520											

<210> 247

<211> 2162

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo multiespecifica anti-jagged4D11v2 anti CTLA-4

<400> 247

gagggtgcacc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccagget	120
ccagggaagg ggctggagtg ggtgtcaagt attgaccogg aaggtcggca gacatattac	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacatc	300
ggcggcaggt cggcctttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctccctcagct	360
agcaccaagg gcccatcggg ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg ccttgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag	780
gtcacatgcg tgggtggtga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actgggtgaa tggcaaggag	960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa	1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg	1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc	1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1320
aagagcctct cctgtctcc gggtaaagga ggtggatctg gaggtggcgg ttcaggtctt	1380

ES 2 912 932 T3

```

ggcggaggct caggtggtgg aggatcaggc ggaggtgaaa ttgtgttgac acagtctcca 1440
ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga gccaccctct cctgcagggc cagtcagagt 1500
gttagcagca gctacttagc ctggtaccag cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc 1560
atctatggtg catccagcag ggccactggc atcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct 1620
gggacagact tcactctcac catcagcaga ctggagcctg aagattttgc agtgtattac 1680
tgtcagcagt atggtagctc accgctcact ttcggcggag ggaccaaggt ggaaatcaaa 1740
cgttccggag ggtcgacat aacttcgtat aatgtatact atacgaagtt atcctcgagc 1800
ggtacccagg tgcagctggt gcagactggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg 1860
agactctcct gtgcagcctc tggatccacc tttagcagct atgccatgag ctgggtccgc 1920
caggctccag ggaaggggct ggagtgggtc tcagctatta gtggtagtgg tggtagcaca 1980
tactacgcag actccgtgaa gggccggtc accatctcca gagacaattc caagaacacg 2040
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaca 2100
aactcccttt actggtactt cgatctctgg ggccgtggca ccctggtcac tgtctcttca 2160
gc 2162

```

<210> 248

<211> 722

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo multiespecifica anti-jagged4D11v2 anti CTLA-4

<400> 248

```

Glu Val His Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30

```

```

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

```

```

Ser Ser Ile Asp Pro Glu Gly Arg Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

```

```

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95

```

ES 2 912 932 T3

Ala	Lys	Asp	Ile	Gly	Gly	Arg	Ser	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly		
			100				105			110							
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
			115				120	125									
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu		
			130	135			140										
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp		
			145	150			155										160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu		
			165				170			175							
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		
			180				185			190							
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro		
			195				200			205							
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		
			210	215			220										
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro		
			225	230			235										240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		
			245				250			255							
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
			260				265			270							
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
			275				280			285							
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
			290	295			300										
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
			305	310			315										320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys		
			325				330			335							
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr		

ES 2 912 932 T3

340		345		350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr	355	360		365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu	370	375		380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	385	390		395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	405	410		415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	420	425		430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	435	440		445
Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser	450	455		460
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro	465	470		475
Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg	485	490		495
Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys	500	505		510
Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala	515	520		525
Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	530	535		540
Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr	545	550		555
Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys	565	570		575
Val Glu Ile Lys Arg Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val	580	585		590

ES 2 912 932 T3

Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln Val Gln Leu Val Gln
 595 600 605
 Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 610 615 620
 Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg
 625 630 635 640
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser
 645 650 655
 Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 660 665 670
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 675 680 685
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Ser Leu Tyr
 690 695 700
 Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 705 710 715 720

Ala Ser

<210> 249

<211> 1461

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo multiespecífico anti-jagged4D11v2 anti CTLA-4

<220>

<221> característica_miac

<222> (545)..(545)

<223> n puede ser cualquier aminoácido

<400> 249

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgcg gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag acggttgtgg cgcctccgtt attcggccaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa acgtacgggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc	360

ES 2 912 932 T3

```

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgancaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtggagggtg atctggaggt      660
ggcggttcag gctctggcgg aggctcaggt ggtggaggat caggcggagg tgaaattgtg      720
ttgacacagt ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg aaagagccac cctctcctgc      780
agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcctggt accagcagaa acctggccag      840
gctcccaggc tctcatcta tgggtgcatcc agcagggcca ctggcatccc agacaggttc      900
agtggcagtg ggtctgggac agacttcact ctcaccatca gcagactgga gcctgaagat      960
tttgacagt attactgtca gcagtatggt agctcacgcg tcactttcgg cggagggacc     1020
aaggtggaaa tcaaacgttc cggaggggtcg accataactt cgtataatgt atactatacg     1080
aagttatcct cgagcggtag ccagggtgcag ctggtgcaga ctgggggagg cgtggtccag     1140
cctgggaggt ccctgagact ctctgtgca gcctctggat ccaccttag cagctatgcc     1200
atgagctggg tccgccaggc tccagggaag gggctggagt gggctctcagc tattagtgg      1260
agtgggtgta gcacatacta cgcagactcc gtgaagggcc ggttcaccat ctccagagac     1320
aattccaaga acacgctgta tctgcaaatg aacagcctga gagccgagga cacggccgta     1380
tattactgtg cgacaaaactc cctttactgg tacttcgatc tctggggccg tggcaccctg     1440
gtcactgtct cttcagctag c                                     1461

```

<210> 250

<211> 487

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo multiespecífico anti-jagged4D11v2 anti CTLA-4

<220>

<221> característica_miac

<222> (182)..(182)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 250

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

```

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

```

ES 2 912 932 T3

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Val Val Ala Pro Pro
 85 90 95
 Leu Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Xaa Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val
 225 230 235 240
 Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
 245 250 255
 Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 260 265 270
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly

ES 2 912 932 T3

275		280		285
Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly	290	295	300	
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp	305	310	315	320
Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe	325	330	335	
Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Gly Gly Ser Thr Ile	340	345	350	
Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln	355	360	365	
Val Gln Leu Val Gln Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser	370	375	380	
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ser Tyr Ala	385	390	395	400
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser	405	410	415	
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys	420	425	430	
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu	435	440	445	
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	450	455	460	
Thr Asn Ser Leu Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu	465	470	475	480
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	485			

<210> 251

<211> 1593

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo multiespecífico activable 5342-1204-4D11v2-CTLA-4 anti-jagged anti CTLA-4

<220>

<221> Característica_msc

<222> (677)..(677)

<223> n puede ser cualquier aminoácido

<400> 251

ES 2 912 932 T3

```

caagggccagt ctggccagtg caatatttgg ctcgtaggtg gtgattgcag gggctggcag      60
gggggctcga gcggtggcag cgggtggctct ggtggtctga gcggccgttc cgataatcat      120
ggcggcggtt ctgacatcca gatgaccag tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga      180
gacagagtca ccatcacttg ccgggcaagt cagagcatta gcagctattt aaattggtat      240
cagcagaaac cagggaaagc ccctaagctc ctgatctatg cggcatccag ttgcaaagt      300
ggggtcccat caaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcaactct caccatcagc      360
agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcaac agacggttgt ggcgcctccg      420
ttattcggcc aagggaccaa ggtggaaatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc      480
atcttcccg ccatctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg      540
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg      600
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc      660
agcaccctga cgctgancaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc      720
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtggaggt      780
ggatctggag gtggcggttc aggctctggc ggaggtcag gtggtggagg atcaggcgga      840
ggtgaaattg tgttgacaca gtctccaggc accctgtctt tgtctccagg ggaaagagcc      900
accctctcct gcagggccag tcagagtgtt agcagcagct acttagcctg gtaccagcag      960
aaacctggcc aggctccag gctcctcatc tatggtgcat ccagcagggc cactggcatc     1020
ccagacaggt tcagtggcag tgggtctggg acagacttca ctctcaccat cagcagactg     1080
gagcctgaag attttgcagt gtattactgt cagcagtatg gtagctcacc gctcactttc     1140
ggcggaggga ccaaggtgga aatcaaactg tccggagggt cgaccataac ttcgtataat     1200
gtatactata cgaagttatc ctogagcggc acccaggtgc agctggtgca gactggggga     1260
ggcgtggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg atccaccttt     1320
agcagctatg ccatgagctg ggtccgccag gctccaggga aggggctgga gtgggtctca     1380
gctattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc     1440
atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag     1500
gacacggccg tatattactg tgcgacaaac tccctttact ggtacttcga tctctggggc     1560
cgtggcaccc tggtcactgt ctcttcagct agc                                     1593

```

<210> 252

<211> 531

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo multiespecífico activable 5342-1204-4D11v2-CTLA-4 anti-jagged anti CTLA-4

<220>

<221> característica_miac

<222> (226)..(226)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 252

ES 2 912 932 T3

Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Asn	Ile	Trp	Leu	Val	Gly	Gly	Asp	Cys	1	5	10	15
Arg	Gly	Trp	Gln	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	20	25	30	
Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	His	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	35	40	45	
Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	50	55	60	
Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	65	70	75	80
Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	85	90	95	
Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	100	105	110	
Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	115	120	125	
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Val	Val	Ala	Pro	Pro	Leu	Phe	Gly	Gln	130	135	140	
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	145	150	155	160
Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	165	170	175	
Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	180	185	190	

ES 2 912 932 T3

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 195 200 205
 Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 210 215 220
 Leu Xaa Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 225 230 235 240
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 245 250 255
 Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser
 275 280 285
 Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 290 295 300
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 305 310 315 320
 Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg
 325 330 335
 Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 340 345 350
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
 355 360 365
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 370 375 380
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn
 385 390 395 400
 Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln Val Gln Leu Val
 405 410 415
 Gln Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser
 420 425 430
 Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val

ES 2 912 932 T3

435

440

445

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
450 455 460

Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
465 470 475 480

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
485 490 495

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Ser Leu
500 505 510

Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
515 520 525

Ser Ala Ser
530

<210> 253

<211> 1350

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pedsad de anticuerpo anti EGFR C225v5

<400> 253

caggtgcagc tgaacacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt	60
acctgcaccg tgagcggcct tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt gcgccagagc	120
ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac	180
accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaagcca ggtgtttttt	240
aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggataacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc	300
tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccg tggtagccgt gagcgcggct	360
agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag	780
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	840

ES 2 912 932 T3

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgaactg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 1350

<210> 254

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo anti EGFR C225v5

<400> 254

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gln Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

ES 2 912 932 T3

130					135					140					
Gly 145	Cys	Leu	Val	Lys	Asp 150	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro 155	Val	Thr	Val	Ser	Trp 160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu 165	Thr	Ser	Gly	Val	His 170	Thr	Phe	Pro	Ala	Val 175	Leu
Gln	Ser	Ser	Gly 180	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser 185	Ser	Val	Val	Thr	Val 190	Pro	Ser
Ser	Ser	Leu 195	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr 200	Ile	Cys	Asn	Val	Asn 205	His	Lys	Pro
Ser	Asn 210	Thr	Lys	Val	Asp	Lys 215	Lys	Val	Glu	Pro	Lys 220	Ser	Cys	Asp	Lys
Thr 225	His	Thr	Cys	Pro	Pro 230	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu 235	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro 240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe 245	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys 250	Asp	Thr	Leu	Met	Ile 255	Ser
Arg	Thr	Pro	Glu 260	Val	Thr	Cys	Val	Val 265	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
Pro	Glu	Val 275	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr 280	Val	Asp	Gly	Val	Glu 285	Val	His	Asn
Ala	Lys 290	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu 295	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser 300	Thr	Tyr	Arg	Val
Val 305	Ser	Val	Leu	Thr	Val 310	Leu	His	Gln	Asp	Trp 315	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu 320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val 325	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu 330	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu 335	Lys
Thr	Ile	Ser	Lys 340	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro 345	Arg	Glu	Pro	Gln	Val 350	Tyr	Thr
Leu	Pro	Pro 355	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu 360	Thr	Lys	Asn	Gln	Val 365	Ser	Leu	Thr
Cys	Leu 370	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr 375	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala 380	Val	Glu	Trp	Glu

ES 2 912 932 T3

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 255

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos anti EGFR C225v5

<400> 255

cagatcttgc	tgaccagag	ccgggtgatt	ctgagcgtga	gcccggggcga	acgtgtgagc	60
tttagctgcc	gcgcgagcca	gagcattggc	accaacattc	attggtatca	gcagcgacc	120
aacggcagcc	cgcgcctgct	gattaaatat	gcgagcgaaa	gcattagcgg	cattccgagc	180
cgctttagcg	gcagcggcag	cggcacccgat	tttaccctga	gcattaacag	cgtggaaagc	240
gaagatattg	cggattatta	ttgccagcag	aacaacaact	ggccgaccac	ctttggcgcg	300
ggcaccaaac	tggaactgaa	acgtacggtg	gctgcacccat	ctgtcttcat	cttcccgcga	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaactgcc	tctgttgtgt	gcctgctgaa	taactttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	480
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	540
ctgagcaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gt		642

<210> 256

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos anti EGFR C225v5

<400> 256

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly

ES 2 912 932 T3

1	5	10	15
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn	20	25	30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile	35	40	45
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser	65	70	75
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr	85	90	95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210		

<210> 257

<211> 1347

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo anti EGFR C225v5

<400> 257

caggtgcagc tgaacacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt 60
acctgcaccg tgagcggcct tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt gcgccagagc 120
ccgggcaaag gcctggaatg gctgggctgtg atttgagcgc gcggcaacac cgattataac 180
accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaagcca ggtgtttttt 240
aaaatgaaca gcctgcaaag caacgatacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc 300
tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccg tggtagaccgt gagcgcggct 360
agcaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacia gccacgaac accaaggtgg acaagcgcgt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacatgcg tgggtggtga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc a tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgaactg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

<210> 258

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo anti EGFR C225v5

<400> 258

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr

ES 2 912 932 T3

20										25					30				
Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu				
	35						40					45							
Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr				
	50					55				60									
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe				
65					70					75					80				
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Asn	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala				
				85					90					95					
Arg	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly				
			100					105					110						
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe				
		115					120					125							
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu				
	130					135					140								
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp				
145					150					155					160				
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu				
				165					170					175					
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser				
			180					185					190						
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro				
		195					200					205							
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys				
	210					215				220									
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro				
225					230					235					240				
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser				
				245					250					255					
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp				
			260					265						270					

ES 2 912 932 T3

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 259

<211> 648

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos anti EGFR C225v5

<400> 259

ggcgggtaccc agatcttgct gaccagagc ccggtgattc tgagcgtgag cccgggcgaa 60

cgtgtgagct ttagctgccg cgcgagccag agcattggca ccaacattca ttggtatcag 120

cagcgcacca acggcagccc ggcctgctg attaaatatg cgagcgaaag cattagcggc 180

ES 2 912 932 T3

attccgagcc gcttttagcgg cagcggcagc ggcaccgatt ttaccctgag cattaacagc 240
 gtggaaagcg aagatattgc ggattattat tgccagcaga acaacaactg gccgaccacc 300
 tttggcgcgg gcaccaaact ggaactgaaa cgtacgggtg ctgcaccatc tgtcttcac 360
 ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420
 aacttctatc ccagagagggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480
 aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540
 accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600
 catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagcg 648

<210> 260

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos anti EGFR C225v5

<400> 260

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

ES 2 912 932 T3

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 261

<211> 1350

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpos anti EGFR C225v4

<400> 261

cagggtgcagc tgaacacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt	60
acctgcaccg tgagcggcct tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt ggcgcagagc	120
ccgggcaaaag gcctggaatg gctgggctg atttgagcg ggcgcaacac cgattataac	180
accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt	240
aaaatgaaca gcctgcaaag caacgatacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc	300
tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccg tggtagccgt gagcgcggct	360
agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag	780
gtcacatgcg tgggtggtga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa	1020

ES 2 912 932 T3

```

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgaactg      1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc      1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccggtgctg      1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag      1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag      1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga      1350

```

<210> 262

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpos anti EGFR C225v4

<400> 262

```

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1              5              10              15

```

```

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
          20              25              30

```

```

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
          35              40              45

```

```

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
          50              55              60

```

```

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65              70              75              80

```

```

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
          85              90              95

```

```

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
          100              105              110

```

```

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
          115              120              125

```

```

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
          130              135              140

```

```

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145              150              155              160

```

ES 2 912 932 T3

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 263

<211> 645
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpos anti EGFR C225v4

<400> 263

cagatcttgc	tgacccagag	cccggtgatt	ctgagcgtga	gcccgggcga	acgtgtgagc	60
tttagctgcc	gcgcgagcca	gagcattggc	accaacattc	attggtatca	gcagcgacc	120
aacggcagcc	cgcgcctgct	gattaaatat	gcgagcgaaa	gcattagcgg	cattccgagc	180
cgcttttagcg	gcagcggcag	cggcaccgat	tttaccctga	gcattaacag	cgtggaaagc	240
gaagatattg	cggattatta	ttgccagcag	aacaacaact	ggccgaccac	ctttggcgcg	300
ggcaccaaac	tggaactgaa	acgtacggtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgcc	360
tctgatgagc	agtgaaatc	tggaactgcc	tctgttgtgt	gcctgctgaa	taacttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaaggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	480
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	540
ctgagcaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gttag		645

<210> 264
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpos anti EGFR C225v4

<400> 264

Gln	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn
			20					25					30		

ES 2 912 932 T3

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 265

<211> 1350

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpos anti EGFR C225v6

<400> 265

caggtgcagc tgaacacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt 60

acctgcaccg tgagcggctt tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt gcgccagagc 120

cggggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac 180

ES 2 912 932 T3

```

accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt 240
aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggataacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc 300
tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcgcggct 360
agcaccaagg gccatcgggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacatgcg tgggtggtga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacgccagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgc ctgcaccagg actgggtgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tgcagaaaac catctccaaa 1020
gcaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgaactg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1350

```

<210> 266

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpos anti EGFR C225v6

<400> 266

```

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1          5          10          15

```

```

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
          20          25          30

```

```

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
          35          40          45

```

ES 2 912 932 T3

Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr		
50						55					60						
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe		
65					70					75					80		
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala		
				85					90					95			
Arg	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly		
			100					105					110				
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
		115					120					125					
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu		
	130					135					140						
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp		
145					150					155					160		
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu		
				165					170						175		
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		
			180					185					190				
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro		
		195					200					205					
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		
	210					215					220						
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro		
225					230					235					240		
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		
			245						250					255			
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
			260					265					270				
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
	275						280					285					
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
	290					295					300						

ES 2 912 932 T3

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 267

<211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos anti EGFR C225v6

<400> 267

cagatcttgc tgaccagag ccggtgatt ctgagcgtga gccggggcga acgtgtgagc 60
tttagctgcc gcgcgagcca gagcattggc accaacattc attggtatca gcagcgcacc 120
aacggcagcc cgcgcctgct gattaaatat gcgagcgaaa gcattagcgg cattccgagc 180
cgcttttagcg gcagcggcag cggcaccgat ttaccctga gcattaacag cgtggaaagc 240
gaagatattg cggattatta ttgccagcag aacaacaact ggccgaccac ctttggcgcg 300
ggcaccaaac tggaactgaa acgtacgggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

ES 2 912 932 T3

<210> 268
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpos anti EGFR C225v6

<400> 268

10

Gln	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	1	5	10	15
Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	20	25	30	
Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	35	40	45	
Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	65	70	75	80
Glu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											210			

15

<210> 269
 <211> 786
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>

ES 2 912 932 T3

<223> Cadena ligera de anticuerpos activables 3954-1204-C225v5 anti EGFR

<400> 269

caagggcagt	ctggccagt	catctcacct	cgtggttgtc	cggacggccc	atacgtcatg	60
tacggctcga	gcggtggcag	cggtggctct	ggtggatccg	gtctgagcgg	ccgttccgat	120
aatcatggca	gtagcggtag	ccagatcttg	ctgacccaga	gcccggtgat	tctgagcgtg	180
agcccgggag	aacgtgtgag	ctttagctgc	cgcgcgagcc	agagcattgg	caccaacatt	240
cattggtatc	agcagcgcac	caacggcagc	ccgcgcctgc	tgattaaata	tgcgagcgaa	300
agcattagcg	gcattccgag	ccgcttttagc	ggcagcggca	gcggcaccga	ttttaccctg	360
agcattaaca	gcgtggaaag	cgaagatatt	gcggattatt	attgccagca	gaacaacaac	420
tggccgacca	cctttggcgc	gggcaccaaa	ctggaactga	aacgtacggg	ggctgcacca	480
tctgtcttca	tcttcccgcc	atctgatgag	cagttgaaat	ctggaactgc	ctctgttgtg	540
tgcctgctga	ataacttcta	tcccagagag	gccaaagtac	agtggaaggt	ggataacgcc	600
ctccaatcgg	gtaactccca	ggagagtgtc	acagagcagg	acagcaagga	cagcacctac	660
agcctcagca	gcaccctgac	gctgagcaaa	gcagactacg	agaaacacaa	agtctacgcc	720
tgcgaagtca	cccatcaggg	cctgagctcg	cccgtcacia	agagcttcaa	caggggagag	780
5	tgttag					786

<210> 270

<211> 261

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos activables 3954-1204-C225v5 anti EGFR

15 <400> 270

ES 2 912 932 T3

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
 1 5 10 15
 Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Ser Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Ser Ser Gly Thr Gln
 35 40 45
 Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu
 50 55 60
 Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile
 65 70 75 80
 His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
 85 90 95
 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 100 105 110
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu
 115 120 125
 Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
 130 135 140
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 145 150 155 160
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 165 170 175
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 180 185 190
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 195 200 205
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 210 215 220
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 225 230 235 240
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 245 250 255
 Asn Arg Gly Glu Cys
 260

5 <210> 271
 <211> 2139
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cadena pesada de anticuerpos multiespecíficos anti EGFR anti CD3 OKT3

<400> 271

caggtgcagc tgaaacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt	60
acctgcaccg tgagcggcct tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt gcgccagagc	120
ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttgagcg gcggcaacac cgattataac	180
accccgttta ccagcgcct gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt	240
aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggataacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc	300
tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccc tggtagccgt gagcgcggct	360
agcaccaagg gccatcgggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcaciaa gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag	780
gtcacatgcg tgggtggtga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960
tacaagtga aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa	1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgaactg	1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc	1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagga ggtggatctg gaggtggcgg ttcaggtctt	1380
ggcggaggct caggtggtgg aggatcaggc ggaggtcagg ttcagctgca gcagagcgg	1440

ES 2 912 932 T3

```
gcagaactgg cacgtccggg tgcaagcgtt aaaatgagct gtaaagcaag cggttataacc 1500
tttaccocgtt ataccatgca ttgggttaaa cagcgtccgg gtcagggtct ggaatggatt 1560
ggttatatca atccgagccg tggttataacc aactacaacc agaaattcaa agataaagca 1620
accctgacca ccgataaaag cagcagcacc gcctatatgc agctgagcag cctgacctca 1680
gaggatagcg cagtttatta ctgtgcacgc tattatgatg atcactattg cctggattat 1740
tggggtcagg gcaccaccct gaccgttagc agcggtggtg gtggtagtgg tggcggtggt 1800
tcaggcggtg gcggtagcca gattgttctg acccagagtc cggcaattat gagcgcaagt 1860
ccgggtgaaa aagttacat gacctgtagc gccagcagca gcgttagcta tatgaattgg 1920
tatcagcaga aaagcggcac cagcccgaaa cgttggattt atgataccag caaactggca 1980
agcggtggtc cggcacattt tcgtggtagc ggtagcggca cctcatatag cctgaccatt 2040
agcggtatgg aagcagaaga tgcagcaacc tattattgtc agcagtggtc aagcaatccg 2100
tttacctttg gtagtggcac caaactggaa attaatcgt 2139
```

<210> 272

<211> 713

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpos multiespecíficos anti EGFR C225v5 anti CD3 OKT3

<400> 272

```
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1          5          10          15
```

```
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20          25          30
```

```
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35          40          45
```

```
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50          55          60
```

```
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65          70          75          80
```

```
Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gln Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85          90          95
```

```
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100         105         110
```

ES 2 912 932 T3

Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	290	295	300
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	305	310	315
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	325	330	335
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	340	345	350
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	355	360	365

ES 2 912 932 T3

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
 465 470 475 480
 Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala
 485 490 495
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg
 500 505 510
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly
 515 520 525
 Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr
 530 535 540
 Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 545 550 555 560
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr
 565 570 575
 Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly
 580 585 590
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile
 595 600 605
 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys

ES 2 912 932 T3

610

615

620

Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp
625 630 635 640

Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr
645 650 655

Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser
660 665 670

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala
675 680 685

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly
690 695 700

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
705 710

<210> 273

<211> 1434

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecíficos anti EGFR C225v5 anti CD3 OKT3

<400> 273

cagatcttgc tgacccagag ccggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga acgtgtgagc	60
tttagctgcc gcgcgagcca gagcattggc accaacattc attggtatca gcagcgcacc	120
aacggcagcc cgcgcctgct gattaaatat gcgagcgaaa gcattagcgg cattccgagc	180
cgcttttagcg gcagcggcag cggcaccgat ttaccctga gcattaacag cgtggaaagc	240
gaagatattg cggattatta ttgccagcag aacaacaact ggccgaccac ctttggcgcg	300
ggcaccaaac tggaactgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtggaggtgg atctggaggt	660
ggcgggtcag gctctggcgg aggtcaggt ggtggaggat caggcggagg tcaggttcag	720
ctgcagcaga gcggtgcaga actggcacgt ccgggtgcaa gcgttaaaat gagctgtaaa	780

gcaagcgggtt atacctttac ccgttatacc atgcattggg ttaaacagcg tccgggtcag 840
 ggtctggaat ggattggtta tatcaatccg agccgtgggt ataccaacta caaccagaaa 900
 ttcaaagata aagcaaccct gaccaccgat aaaagcagca gcaccgccta tatgcagctg 960
 agcagcctga cctcagagga tagcgagtt tattactgtg cacgctatta tgatgatcac 1020
 tattgcctgg attattgggg tcagggcacc accctgaccg ttagcagcgg tgggtggtggt 1080
 agtgggtggcg gtggttcagg cgggtggcgg agccagattg ttctgaccca gagtccggca 1140
 attatgagcg caagtccggg tgaaaaagtt accatgacct gtagcgccag cagcagcgtt 1200
 agctatatga attggtatca gcagaaaagc ggcaccagcc cgaaacggtg gatttatgat 1260
 accagcaaac tggcaagcgg tggtccggca cattttcgtg gtagcggtag cggcacctca 1320
 tatagcctga ccattagcgg tatggaagca gaagatgcag caacctatta ttgtcagcag 1380
 tggccaagca atccgtttac ctttggtagt ggcaccaaac tggaaattaa tcgt 1434

<210> 274

<211> 478

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecíficos anti EGFR C225v5 anti CD3 OKT3

<400> 274

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

ES 2 912 932 T3

115		120		125											
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
130						135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
			180					185					190		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
		195					200					205			
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
210						215					220				
Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln
225					230					235					240
Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys
				245					250					255	
Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His
			260					265					270		
Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile
		275					280					285			
Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys
290						295					300				
Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu
305					310					315				320	
Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr
				325					330					335	
Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu
			340					345					350		
Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
		355				360						365			

ES 2 912 932 T3

Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala
370 375 380

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
385 390 395 400

Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg
405 410 415

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe
420 425 430

Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met
435 440 445

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
450 455 460

Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
465 470 475

<210> 275

<211> 1575

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecíficos activables 3954-1204-C225v5-OKT3 anti EGFR anti CD3

<400> 275

caaggccagt ctggccagt catctcacct cgtggttgtc cggacggccc atacgtcatg	60
tacggctcga gcggtggcag cgggtggtct ggtggatccg gtctgagcgg ccgttccgat	120
aatcatggca gtacgggtac ccagatcttg ctgaccaga gcccggtgat tctgagcgtg	180
agcccgggag aacgtgtgag ctttagctgc cgcgcgagcc agagcattgg caccaacatt	240
cattggtatc agcagcgcac caacggcagc ccgcgcctgc tgattaaata tgcgagcgaa	300
agcattagcg gcattccgag ccgcttttagc ggcagcggca gcggcaccga ttttaccctg	360
agcattaaca gcgtggaaag cgaagatatt gcggattatt attgccagca gaacaacaac	420
tggccgacca cctttggcgc gggcaccaaa ctggaactga aacgtacggt ggctgcacca	480
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttggtg	540
tgcctgctga ataacttcta tccagagag gccaaagtac agtggagggt ggataacgcc	600
ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac	660
agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc	720
tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag	780

ES 2 912 932 T3

tgtggagggtg gatctggagg tggcgggttca ggctctggcg gaggtcagc tgggtggagga 840
 tcaggcggag gtcagggttca gctgcagcag agcgggtcag aactggcacg tccgggtgca 900
 agcgttaaaa tgagctgtaa agcaagcggc tataccttta cccgttatac catgcattgg 960
 gttaaacagc gtcgggttca gggctctggaa tggattgggt atatcaatcc gagccgtggt 1020
 tataccaact acaaccagaa attcaaagat aaagcaaccg tgaccaccga taaaagcagc 1080
 agcaccgcct atatgcagct gagcagcctg acctcagagg atagcgcagt ttattactgt 1140
 gcacgtatt atgatgatca ctattgcctg gattattggg gtcagggcac caccctgacc 1200
 gttagcagcg gtggtggtgg tagtggtggc ggtggttcag gcggtggcgg tagccagatt 1260
 gttctgaccc agagtccggc aattatgagc gcaagtccgg gtgaaaaagt taccatgacc 1320
 tgtagcgcca gcagcagcgt tagctatatg aattggtatc agcagaaaag cggcaccagc 1380
 ccgaaacggt ggatttatga taccagcaaa ctggcaagcg gtgttccggc acattttcgt 1440
 ggtagcggta gcggcacctc atatagcctg accattagcg gtatggaagc agaagatgca 1500
 gcaacctatt attgtcagca gtggtcaagc aatccgttta cctttggtag tggcaccaaa 1560
 ctggaaatta atcgt 1575

<210> 276

<211> 525

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecíficos activables 3954-1204-C225v5-OKT3 anti EGFR anti CD3

<400> 276

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
 1 5 10 15

Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Ser Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Ser Ser Gly Thr Gln
 35 40 45

Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu
 50 55 60

Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile
 65 70 75 80

His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
 85 90 95

ES 2 912 932 T3

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 100 105 110
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu
 115 120 125
 Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
 130 135 140
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 145 150 155 160
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 165 170 175
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 180 185 190
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 195 200 205
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 210 215 220
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 225 230 235 240
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 245 250 255
 Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu
 275 280 285
 Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met
 290 295 300
 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp
 305 310 315 320
 Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
 325 330 335
 Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala

ES 2 912 932 T3

340 345 350
 Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
 355 360 365
 Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr
 370 375 380
 Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 385 390 395 400
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 405 410 415
 Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
 420 425 430
 Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser
 435 440 445
 Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp
 450 455 460
 Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg
 465 470 475 480
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu
 485 490 495
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro
 500 505 510
 Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
 515 520 525

<210> 277

<211> 2166

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpos multiespecíficos anti EGFR C225v5 anti CTLA-4

<400> 277

caggtgcagc tgaacacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt	60
acctgcaccg tgagcggcctt tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt ggcacagagc	120
ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac	180

ES 2 912 932 T3

accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt	240
aaaatgaaca gcoctgcaaag ccaggataacc gcgattttatt attgcgcgcg cgcgctgacc	300
tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccg tggtagaccgt gagcgcggct	360
agcaccaagg gcccatcggt etttcccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttcccg aaccggtagc ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtcctaca gtccctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag	780
gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac	840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
acgtaccgtg tggtagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa	1020
gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacacctgc ccccatcccg ggatgaactg	1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatccag cgacatcgcc	1140
gtggagtggtg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag	1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggtc tgcacaacca ctacacgcag	1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagga ggtggatctg gaggtggcgg ttcaggctct	1380
ggcggaggct cagggtgttg aggatcaggc ggaggtgaaa ttgtgttgac acagtctcca	1440
ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga gccaccctct cctgcagggc cagtcagagt	1500
gttagcagca gctacttagc ctggtaccag cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc	1560
atctatggtg catccagcag ggccactggc atcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct	1620
gggacagact tcactctcac catcagcaga ctggagcctg aagattttgc agtgtattac	1680
tgtcagcagt atggtagctc accgctcact ttccggcggag ggaccaagggt ggaatcaaa	1740
cgttccggag ggtcgacct aacttcgtat aatgtatact atacgaagtt atcctcgagc	1800
ggtacccagg tgcagctggt gcagactggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg	1860
agactctcct gtgcagcctc tggatccacc tttagcagct atgccatgag ctgggtccgc	1920
caggctccag ggaaggggct ggagtggtgc tcagctatta gtggtagtgg tggtagcaca	1980
tactacgcag actccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaatc caagaacagc	2040
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaca	2100
aactcccttt actggtagct cgatctctgg ggccgtggca ccctgggtcac tgtctcttca	2160
gctagc	2166

5 <210> 278
 <211> 722
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>

ES 2 912 932 T3

<223> Cadena pesada de anticuerpos multiespecíficos anti EGFR C225v5 anti CTLA-4

<400> 278

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gln Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

ES 2 912 932 T3

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

ES 2 912 932 T3

435 440 445
 Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 465 470 475 480
 Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 485 490 495
 Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 500 505 510
 Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala
 515 520 525
 Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 530 535 540
 Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
 545 550 555 560
 Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 565 570 575
 Val Glu Ile Lys Arg Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val
 580 585 590
 Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln Val Gln Leu Val Gln
 595 600 605
 Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 610 615 620
 Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg
 625 630 635 640
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser
 645 650 655
 Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 660 665 670
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 675 680 685
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Ser Leu Tyr
 690 695 700
 Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 705 710 715 720
 Ala Ser
 <210> 279

<211> 1461
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecíficos anti EGFR C225v5 anti CTLA-4

<400> 279

```

cagatcttgc tgacccagag cccggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga acgtgtgagc      60
tttagctgcc gcgcgagcca gagcattggc accaacattc attggtatca gcagcgacc      120
aacggcagcc cgcgcctgct gattaaatat gcgagcgaaa gcattagcgg cattccgagc      180
cgcttttagcg gcagcggcag cggcaccgat ttaccctga gcattaacag cgtggaaagc      240
gaagatattg cggattatta ttgccagcag aacaacaact ggccgaccac ctttggcgcg      300
ggcaccaaac tggaaactga acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtggaggtgg atctggaggt      660
ggcgggtcag gctctggcgg aggctcaggt ggtggaggat caggcggagg tgaaattgtg      720
ttgacacagt ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg aaagagccac cctctcctgc      780
agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcctggt accagcagaa acctggccag      840
gctcccaggc tctcatcta tgggtgcatcc agcagggcca ctggcatccc agacaggttc      900
agtggcagtg ggtctgggac agacttcaact ctcaccatca gcagactgga gcctgaagat      960
tttgacagtg attactgtca gcagtatggt agctcacgcg tcactttcgg cggagggacc      1020
aaggtggaaa tcaaacgttc cggagggtcg accataactt cgtataatgt atactatacg      1080
aagttatcct cgagcggtag ccagggtcag ctggtgcaga ctgggggagg cgtggtccag      1140
cctgggaggt ccctgagact ctctgtgca gcctctggat ccacctttag cagctatgcc      1200
atgagctggg tccgccaggc tccaggaag gggctggagt gggctctcagc tattagtgg      1260
agtgggtgta gcacatacta cgcagactcc gtgaagggcc ggttcaccat ctccagagac      1320
aattccaaga acacgctgta tctgcaaagt aacagcctga gagccgagga cacggccgta      1380
tattactgtg cgacaaactc cctttactgg tacttcgatc tctggggccg tggcaccctg      1440
gtcactgtct cttcagctag c                                     1461

```

10

15

<210> 280
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecíficos anti EGFR C225v5 anti CTLA-4

<400> 280

ES 2 912 932 T3

Gln	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	1	5	10	15
Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	20	25	30	
Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	35	40	45	
Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	65	70	75	80
Glu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	

ES 2 912 932 T3

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val
 225 230 235 240
 Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
 245 250 255
 Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 260 265 270
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly
 275 280 285
 Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 290 295 300
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp
 305 310 315 320
 Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe
 325 330 335
 Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Gly Gly Ser Thr Ile
 340 345 350
 Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln
 355 360 365
 Val Gln Leu Val Gln Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser
 370 375 380
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 385 390 395 400
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 405 410 415
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

ES 2 912 932 T3

420

425

430

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
435 440 445

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
450 455 460

Thr Asn Ser Leu Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
465 470 475 480

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
485

<210> 281

<211> 1602

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecíficos 3954-1204-C225v5-CTLA-4 anti EGFR anti CTLA-4

<400> 281

caagggccagt ctggccagtg catctcacct cgtggttgtc cggacggccc atacgtcatg	60
tacggctcga gcggtggcag cgggtggctct ggtggatccg gtctgagcgg ccgttcgat	120
aatcatggca gtagcggtag ccagatcttg ctgaccacga gcccggtgat tctgagcgtg	180
agcccgggcg aacgtgtgag ctttagctgc cgcgcgagcc agagcattgg caccaacatt	240
cattggtatc agcagcgcac caacggcagc ccgcgcctgc tgattaaata tgcgagcgaa	300
agcattagcg gcattccgag ccgcttttagc ggcagcggca gcggcaccga ttttaccctg	360
agcattaaca gcgtggaaag cgaagatatt gcggattatt attgccagca gaacaacaac	420
tggccgacca cctttggcgc gggcaccaaa ctggaactga aacgtacggt ggctgcacca	480
tctgtcttca tcttcccgc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttggtg	540
tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc	600
ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac	660
agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc	720
tgcgaagtca cccatcaggc cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag	780
tgtggagggtg gatctggagg tggcggttca ggctctggcg gaggctcagg tgggtggagga	840
tcaggcggag gtgaaattgt gttgacacag tctccaggca ccctgtcttt gtctccaggg	900
gaaagagcca ccctctcctg cagggccagt cagagtgtta gcagcagcta cttagcctgg	960
taccagcaga aacctggcca ggctcccagg ctctcatct atggtgcatc cagcagggcc	1020

ES 2 912 932 T3

actggcatcc cagacagggt cagtggcagt ggggtctggga cagacttcac tctcaccatc 1080
 agcagactgg agcctgaaga ttttgcagtg tattactgtc agcagtatgg tagctcacog 1140
 ctactttcg gcggaggggac caagggtgaa atcaaacgtt ccggagggtc gaccataact 1200
 tcgtataatg tatactatac gaagttatcc tcgagcggta cccagggtgca gctgggtgcag 1260
 actggggggag gcgtgggtcca gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga 1320
 tccaccttta gcagctatgc catgagctgg gtccgccagg ctccaggga ggggctggag 1380
 tgggtctcag ctattagtgg tagtgggtgg agcacatact acgcagactc cgtgaagggc 1440
 cggttcacca tctccagaga caattccaag aacacgctgt atctgcaa at gaacagcctg 1500
 agagccgagg acacggccgt atattactgt gcgacaaact ccctttactg gtacttcgat 1560
 ctctggggcc gtggcaccct ggtcactgtc tcttcagcta gc 1602

<210> 282

<211> 534

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecíficos 3954-1204-C225v5-CTLA-4 anti EGFR anti CTLA-4

<400> 282

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
 1 5 10 15

Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Ser Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Ser Ser Gly Thr Gln
 35 40 45

Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu
 50 55 60

Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile
 65 70 75 80

His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
 85 90 95

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 100 105 110

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu
 115 120 125

ES 2 912 932 T3

Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
 130 135 140
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 145 150 155 160
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 165 170 175
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 180 185 190
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 195 200 205
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 210 215 220
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 225 230 235 240
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 245 250 255
 Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu
 275 280 285
 Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
 290 295 300
 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
 305 310 315 320
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala
 325 330 335
 Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 340 345 350
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe
 355 360 365
 Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly
 370 375 380

ES 2 912 932 T3

Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr
385 390 395 400

Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln Val
405 410 415

Gln Leu Val Gln Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu
420 425 430

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met
435 440 445

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala
450 455 460

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
465 470 475 480

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
485 490 495

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
500 505 510

Asn Ser Leu Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
515 520 525

Thr Val Ser Ser Ala Ser
530

<210> 283

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de codificación de péptido espaciador

<400> 283

caaggccagt ctggccag 18

<210> 284

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>secuencia de codificación de péptido de enmascaramiento

<400> 284

tgcattctcac ctctgtgttg tccqqacqqc ccatacgtca tgtac 45

<210> 285

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de codificacioón de péptido conector

<400> 285

ES 2 912 932 T3

ggctcgagcg gtggcagcgg tggctctggt ggatccggt 39

5 <210> 286
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 1204 secuencia codificadora de Substrato

<400> 286
 ctqaqcqqcc gttccgataa teat 24

15 <210> 287
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> secuencia codificadora de péptido conector

<400> 287
 ggcagtagcg gtacc 15

25 <210> 288
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> péptido conector

<400> 288

35 Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 1 5 10

<210> 289
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> péptido conector

45 <400> 289

Gly Ser Ser Gly Thr
 1 5

50 <210> 290
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Anticuerpo OKT3m scFv con conectro largo

<400> 290

ES 2 912 932 T3

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
 20 25 30
 Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
 35 40 45
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
 50 55 60
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 65 70 75 80
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
 85 90 95
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
 100 105 110
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
 115 120 125
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val
 145 150 155 160
 Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
 165 170 175
 Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
 180 185 190
 Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
 195 200 205
 Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala
 225 230 235 240
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser
 245 250 255
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
 260

<210> 291
 <211> 795
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo OKT3m scFv con conector largo

5

<400> 291

```

ggaggtggat ctggaggtgg cggttcaggc tctggcggag gctcaggtgg tggaggatca      60
ggcggaggtc aggttcagct gcagcagagc ggtgcagaac tggcacgtcc ggggtgcaagc      120
gttaaaatga gctgtaaagc aagcggttat acctttaccc gttataccat gcattggggtt      180
aaacagcgtc cgggtcaggg tctggaatgg attggttata tcaatccgag ccgtggttat      240
accaactaca accagaaatt caaagataaa gcaaccctga ccaccgataa aagcagcagc      300
accgcctata tgcagctgag cagcctgacc tcagaggata gcgcagttta ttactgtgca      360
cgctattatg atgatcacta tagcctggat tattggggtc agggcaccac cctgaccgtt      420
agcagcggtg gtggtggtag tgggtggcggg ggttcaggcg gtggcggtag ccagattgtt      480
ctgacccaga gtccggcaat tatgagcgca agtccgggtg aaaaagttac catgacctgt      540
agcgccagca gcagcgttag ctatatgaat tggatcagc agaaaagcgg caccagcccg      600
aaacgttggg tttatgatac cagcaaactg gcaagcggtg ttccggcaca ttttcgtggt      660
agcggtagcg gcacctcata tagcctgacc attagcggta tggaagcaga agatgcagca      720
acctattatt gtcagcagtg gtcaagcaat ccgtttacct ttggtagtgg caccaaaactg      780
gaaattaatc gttga                                                    795

```

10

<210> 292

<211> 246

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Anticuerpo OKT3m scFv con conector corto

<400> 292

ES 2 912 932 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 130 135 140
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 145 150 155 160
 Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 165 170 175
 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 180 185 190
 Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 195 200 205
 Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 210 215 220
 Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
 225 230 235 240
 Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 245

- 5 <210> 293
 <211> 738
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Anticuerpo OKT3m scFv con conector corto
 <400> 293

ES 2 912 932 T3

```

cagggttcagc tgcagcagag cgggtgcagaa ctggcacgtc cgggtgcaag cgttaaaatg      60
agctgtaaaag caagcgggta tacctttacc cgttatacca tgcattgggt taaacagcgt      120
ccgggtcagg gtctggaatg gattggttat atcaatccga gccgtgggta taccaactac      180
aaccagaaat tcaaagataa agcaaccctg accaccgata aaagcagcag caccgcctat      240
atgcagctga gcagcctgac ctcagaggat agcgcagttt attactgtgc acgctattat      300
gatgatcact atagcctgga ttattggggg cagggcacca ccctgaccgt tagcagcggg      360
gggtggggta gtggtggcgg tgggttcaggc ggtggcggta gccagattgt tctgaccag      420
agtccggcaa ttatgagcgc aagtccgggt gaaaaagtta ccatgacctg tagcgccagc      480
agcagcgtta gctatatgaa ttggtatcag cagaaaagcg gcaccagccc gaaacgttg      540
atztatgata ccagcaaact ggcaagcggg gttccggcac attttcgtgg tagcggtagc      600
ggcacctcat atagcctgac cattagcggg atggaagcag aagatgcagc aacctattat      660
tgtcagcagt ggtcaagcaa tccgtttacc tttggtagtg gcaccaaact ggaaattaat      720
cgtggaggtg gtggatcc                                738

```

<210> 294

<211> 695

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo multiespecifico C225v5-OKT3m-H-N

<400> 294

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1          5          10          15

```

```

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
          20          25          30

```

```

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45

```

ES 2 912 932 T3

Gly 50	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg 55	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr 60	Asn	Gln	Lys	Phe
Lys 65	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu 70	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser 75	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr 80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser 85	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp 90	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
Ala	Arg	Tyr	Tyr 100	Asp	Asp	His	Tyr	Ser 105	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly 110	Gln	Gly
Thr	Thr	Leu 115	Thr	Val	Ser	Ser	Gly 120	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly 125	Gly	Gly	Gly
Ser 130	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln 135	Ile	Val	Leu	Thr	Gln 140	Ser	Pro	Ala	Ile
Met 145	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly 150	Glu	Lys	Val	Thr	Met 155	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser 160
Ser	Ser	Val	Ser	Tyr 165	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln 170	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr 175	Ser
Pro	Lys	Arg	Trp 180	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser 185	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly 190	Val	Pro
Ala	His	Phe 195	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser 200	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser 205	Leu	Thr	Ile
Ser 210	Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Asp 215	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr 220	Cys	Gln	Gln	Trp
Ser 225	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr 230	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr 235	Lys	Leu	Glu	Ile	Asn 240
Arg	Gly	Gly	Gly	Gly 245	Ser	Gln	Val	Gln	Leu 250	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro 255	Gly
Leu	Val	Gln 260	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser 265	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly
Phe	Ser	Leu 275	Thr	Asn	Tyr	Gly	Val 280	His	Trp	Val	Arg 285	Gln	Ser	Pro	Gly
Lys 290	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly 295	Val	Ile	Trp	Ser	Gly 300	Gly	Asn	Thr	Asp

ES 2 912 932 T3

Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser
 305 310 315 320
 Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gln Asp Thr
 325 330 335
 Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe
 340 345 350
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr
 355 360 365
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 370 375 380
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 385 390 395 400
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 405 410 415
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 420 425 430
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 435 440 445
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 450 455 460
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 465 470 475 480
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 485 490 495
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 500 505 510
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 515 520 525
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 530 535 540
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 545 550 555 560

ES 2 912 932 T3

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
565 570 575

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
580 585 590

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
595 600 605

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
610 615 620

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
625 630 635 640

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
645 650 655

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
660 665 670

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
675 680 685

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

<210> 295

<211> 2088

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo multiespecifico C225v5-OKT3m-H-N

<400> 295

cagggttcagc tgcagcagag cgggtgcagaa ctggcacgtc cgggtgcaag cgttaaaatg	60
agctgtaaag caagcgggta tacctttacc cggtatacca tgcattgggt taaacagcgt	120
cggggtcagg gtctggaatg gattggttat atcaatccga gccgtgggta taccaactac	180
aaccagaaat tcaaagataa agcaaccctg accaccgata aaagcagcag caccgcctat	240
atgcagctga gcagcctgac ctacagaggat agcgcagttt attactgtgc acgctattat	300
gatgatcact atagcctgga ttattgggggt cagggcacca ccctgaccgt tagcagcggg	360
gggtgggtgta gtgggtggcg tggttcaggc ggtggcggtta gccagattgt tctgacccag	420
agtcgggcaa ttatgagcgc aagtcggggt gaaaaagtta ccatgacctg tagcgccagc	480

ES 2 912 932 T3

```

agcagcggtta gctatatgaa ttggtatcag cagaaaagcg gcaccagccc gaaacgttgg      540
atztatgata ccagcaaact ggcaagcggg gttccggcac attttcgtgg tagcggtagc      600
ggcacctcat atagcctgac cattagcggg atggaagcag aagatgcagc aacctattat      660
tgtcagcagt ggtcaagcaa tccgtttacc tttggtagtg gcaccaaact ggaaattaat      720
cgtggaggtg gtggatccca ggtgcagctg aaacagagcg gcccgggcct ggtgcagccg      780
agccagagcc tgagcattac ctgcaccgtg agcggcttta gcctgaccaa ctatggcgtg      840
cattgggtgc gccagagccc gggcaaaggc ctggaatggc tgggcgtgat ttggagcggc      900
ggcaacaccg attataacac cccgtttacc agccgcctga gcattaacaa agataacagc      960
aaaagccagg tgttttttaa aatgaacagc ctgcaaagcc aggataccgc gatttattat     1020
tgcgcgcgcg cgctgaccta ttatgattat gaatttgcgt attggggcca gggcacctcg     1080
gtgaccgtga gcgcggctag caccaaggcg ccacgcgtct tccccctggc accctctcc     1140
aagagcacct ctggggggcac agcgggcctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa     1200
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc     1260
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc     1320
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacagc ccagcaacac caaggtggac     1380
aagaaagttg agcccaaact ttgtgacaaa actcacacat gccaccctg cccagcacct     1440
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tttcccccaa aaccaagga caccctcatg     1500
atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag     1560
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg     1620
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac     1680
tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc     1740
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc     1800
ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc     1860
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag     1920
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg     1980
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg     2040
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga      2088

```

<210> 296

<211> 713

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo multiespecifico C225v5-OKT3m-H-C

<400> 296

ES 2 912 932 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr	20	25	30	
Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	35	40	45	
Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	50	55	60	
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe	65	70	75	80
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Arg	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser				

ES 2 912 932 T3

245								250				255			
Arg	Thr	Pro	Glu 260	Val	Thr	Cys	Val	Val 265	Val	Asp	Val	Ser	His 270	Glu	Asp
Pro	Glu	Val 275	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr 280	Val	Asp	Gly	Val	Glu 285	Val	His	Asn
Ala	Lys 290	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu 295	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser 300	Thr	Tyr	Arg	Val
Val 305	Ser	Val	Leu	Thr	Val 310	Leu	His	Gln	Asp	Trp 315	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu 320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val 325	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu 330	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu 335	Lys
Thr	Ile	Ser	Lys 340	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro 345	Arg	Glu	Pro	Gln	Val 350	Tyr	Thr
Leu	Pro	Pro 355	Ser	Arg	Glu	Glu	Met 360	Thr	Lys	Asn	Gln	Val 365	Ser	Leu	Thr
Cys	Leu 370	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr 375	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala 380	Val	Glu	Trp	Glu
Ser 385	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu 390	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr 395	Thr	Pro	Pro	Val	Leu 400
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser 405	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser 410	Lys	Leu	Thr	Val	Asp 415	Lys
Ser	Arg	Trp	Gln 420	Gln	Gly	Asn	Val	Phe 425	Ser	Cys	Ser	Val	Met 430	His	Glu
Ala	Leu	His 435	Asn	His	Tyr	Thr	Gln 440	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu 445	Ser	Pro	Gly
Lys	Gly 450	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser 460	Gly	Gly	Gly	Ser
Gly 465	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly 470	Gly	Gly	Gln	Val	Gln 475	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly 480
Ala	Glu	Leu	Ala	Arg 485	Pro	Gly	Ala	Ser	Val 490	Lys	Met	Ser	Cys	Lys 495	Ala

ES 2 912 932 T3

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg
500 505 510

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly
515 520 525

Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr
530 535 540

Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser
545 550 555 560

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr
565 570 575

Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly
580 585 590

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile
595 600 605

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
610 615 620

Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp
625 630 635 640

Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr
645 650 655

Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser
660 665 670

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala
675 680 685

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly
690 695 700

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
705 710

<210> 297

<211> 2142

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo multiespecifico C225v5-OKT3m-H-C

<400> 297

ES 2 912 932 T3

caggtgcagc tgaacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt 60
 acctgcaccg tgagcggcct tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt gcgccagagc 120
 ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac 180
 accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt 240
 aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggataacc gcgattttatt attgcgcgcg cgcgctgacc 300
 tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcgcggct 360
 agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
 atctgcaacg tgaatcaciaa gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa 660
 tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag 780
 gtcacatgcg tgggtggtga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 840
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggaggagatg 1080
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgctctg 1200
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgag 1320
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaagga ggtggatctg gaggtggcgg ttcaggctct 1380
 ggcggaggct caggtggtgg aggatcaggc ggaggtcagg ttcagctgca gcagagcgg 1440
 gcagaactgg cacgtccggg tgcaagcgtt aaaatgagct gtaaagcaag cggttatacc 1500
 tttaccctgt ataccatgca ttgggttaaa cagcgtccgg gtcagggtct ggaatggatt 1560
 gggttatatca atccgagccg tgggtatacc aactacaacc agaaattcaa agataaagca 1620
 accctgacca ccgataaaag cagcagcacc gcctatatgc agctgagcag cctgacctca 1680
 gaggatagcg cagtttatta ctgtgcacgc tattatgatg atcactatag cctggattat 1740
 tggggtcagg gcaccacct gaccgttagc agcgggtggt gtggtagtgg tggcgggtgt 1800
 tcaggcgggt gcggtagcca gattgttctg acccagagtc cggcaattat gagcgcaagt 1860
 ccgggtgaaa aagttaccat gacctgtagc gccagcagca gcgttagcta tatgaattgg 1920
 tatcagcaga aaagcggcac cagcccgaaa cggttgattt atgataccag caaactggca 1980
 agcgggtgtc cggcacattt tcgtggtagc ggtagcggca cctcatatag cctgaccatt 2040
 agcggtatgg aagcagaaga tgcagcaacc tattattgtc agcagtggtc aagcaatccg 2100
 tttacctttg gtagtggcac caaactggaa attaatcgtt ga 2142

ES 2 912 932 T3

<211> 478

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecíficos C225v5-OKT3m-L-C

<400> 298

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

ES 2 912 932 T3

165										170					175				
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr				
			180					185					190						
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser				
		195					200					205							
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly				
	210					215					220								
Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln				
225					230					235					240				
Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys				
				245					250					255					
Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His				
			260					265					270						
Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile				
		275					280					285							
Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys				
	290					295					300								
Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu				
305					310					315					320				
Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr				
				325					330					335					
Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu				
			340					345					350						
Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly				
		355				360						365							
Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala				
	370					375					380								
Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val				
385					390					395					400				
Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg				
			405						410					415					

ES 2 912 932 T3

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe
420 425 430

Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met
435 440 445

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
450 455 460

Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
465 470 475

<210> 299

<211> 1437

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecíficos C225v5-OKT3m-L-C

<400> 299

gacatcttgc	tgaccagag	cccggtgatt	ctgagcgtga	gcccgggcca	acgtgtgagc	60
tttagctgcc	gcgcgagcca	gagcattggc	accaacattc	attggtatca	gcagcgcacc	120
aacggcagcc	cgcgcctgct	gattaaatat	gcgagcgaaa	gcattagcgg	cattccgagc	180
cgctttagcg	gcagcggcag	cggcaccgat	tttaccctga	gcattaacag	cgtggaaagc	240
gaagatattg	cggattatta	ttgccagcag	aacaacaact	ggccgaccac	ctttggcgcg	300
ggcaccaaac	tggaactgaa	acgtacggtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgcga	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaactgcc	tctgttgtgt	gcctgctgaa	taacttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	480
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	540
ctgagcaaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gtggaggtgg	atctggaggt	660
ggcgggttcag	gctctggcgg	aggctcaggt	ggtggaggat	caggcggagg	tcagggttcag	720
ctgcagcaga	gcggtgcaga	actggcacgt	ccgggtgcaa	gcgttaaaat	gagctgtaaa	780
gcaagcgggt	atacctttac	ccgttatacc	atgcattggg	ttaaacagcg	tccgggtcag	840
ggtctggaat	ggattgggta	tatcaatccg	agccgtgggt	ataccaacta	caaccagaaa	900
ttcaaagata	aagcaaccct	gaccaccgat	aaaagcagca	gcaccgccta	tatgcagctg	960
agcagcctga	cctcagagga	tagcgcagtt	tattactgtg	cacgctatta	tgatgatcac	1020
tatagcctgg	attattgggg	tcagggcacc	accctgaccg	ttagcagcgg	tggtgggtgg	1080
agtgggtggcg	gtgggttcagg	cgggtggcgg	agccagattg	ttctgaccca	gagtcggcca	1140

ES 2 912 932 T3

attatgagcg caagtccggg tgaaaaagtt accatgacct gtagcgccag cagcagcggtt 1200
 agctatatga attggtatca gcagaaaagc ggcaccagcc cgaaacggtg gatttatgat 1260
 accagcaaac tggcaagcgg tggtccggca cattttcgtg gtagcggtag cggcacctca 1320
 tatagcctga ccattagcgg tatggaagca gaagatgcag caacctatta ttgtcagcag 1380
 tgggtcaagca atccggtttac ctttggtagt ggcaccaaac tggaaattaa tcgttag 1437

<210> 300

<211> 695

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpos multiespecíficos C225v5 N297Q - OKT3m-H-N

<400> 300

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser

ES 2 912 932 T3

165								170				175			
Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
			180					185					190		
Ala	His	Phe	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile
		195					200					205			
Ser	Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
	210					215					220				
Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Asn
225					230					235					240
Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly
				245					250					255	
Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly
			260					265					270		
Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly
		275					280					285			
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp
	290					295					300				
Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Asn	Ser
305					310					315					320
Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Gln	Asp	Thr
				325				330						335	
Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe
			340				345						350		
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr
		355					360					365			
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
	370					375					380				
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
385					390					395					400
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
				405				410						415	

ES 2 912 932 T3

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 420 425 430
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 435 440 445
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 450 455 460
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 465 470 475 480
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 485 490 495
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 500 505 510
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 515 520 525
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 530 535 540
 Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 545 550 555 560
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 565 570 575
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 580 585 590
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 595 600 605
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 610 615 620
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 625 630 635 640
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 645 650 655
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 660 665 670
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 675 680 685
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 690 695
 <210> 301
 <211> 2088
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpos multiespecíficos C225v5 N297Q - OKT3m-H-N

<400> 301

cagggttcagc tgcagcagag cgggtgcagaa ctggcacgctc cgggtgcaag cgttaaaatg	60
agctgtaaag caagcgggta tacctttacc cggtatacca tgcattgggt taaacagcgt	120
ccgggtcagg gtctggaatg gattgggttat atcaatccga gccgtgggta taccaactac	180
aaccagaaat tcaaagataa agcaaccctg accaccgata aaagcagcag caccgcctat	240
atgcagctga gcagcctgac ctacagaggat agcgcagttt attactgtgc acgctattat	300
gatgatcact atagcctgga ttattggggt cagggcacca ccctgaccgt tagcagcgggt	360
gggtggtggtg gtggtggcgg tggttcaggc ggtggcggta gccagattgt totgaccag	420
agtccggcaa ttatgagcgc aagtccgggt gaaaaagtta ccatgacctg tagcgccagc	480
agcagcggtta gctatatgaa ttggtatcag cagaaaagcg gcaccagccc gaaacgttgg	540
atztatgata ccagcaaact ggcaagcgggt gttccggcac attttcgtgg tagcggtagc	600
ggcacctcat atagcctgac cattagcgggt atggaagcag aagatgcagc aacctattat	660
tgtcagcagt ggtcaagcaa tccgtttacc tttggtagtg gcaccaaact ggaaattaat	720
cgtggagggtg gtggatccca ggtgcagctg aaacagagcg gcccgggcct ggtgcagccg	780
agccagagcc tgagcattac ctgcaccgtg agcggcttta gcctgaccaa ctatggcgtg	840
cattgggtgc gccagagccc gggcaaaggc ctggaatggc tgggcgtgat ttggagcggc	900
ggcaacaccg attataacac cccgtttacc agccgcctga gcattaacaa agataacagc	960
aaaagccagg tgttttttaa aatgaacagc ctgcaaagcc aggataccgc gatttattat	1020
tgcgcgcgcg cgctgacctt ttatgattat gaatttgcgt attggggcca gggcacccctg	1080
gtgaccgtga gcgcggctag caccaagggc ccatcgggtct tccccctggc accctcctcc	1140
aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa	1200
ccggtgacgg tgctgtggaa ctacggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct	1260
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc	1320

ES 2 912 932 T3

```

ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac      1380
aagaaagtgt agcccaaata ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct      1440
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg      1500
atctcccggg cccctgaggt cacatgctgt gtggtggacg tgagccacga agaccctgag      1560
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg      1620
gaggagcagt accagagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac      1680
tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc      1740
gagaaaacca tctccaaagc caaaggcgag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc      1800
ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc      1860
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag      1920
accacgcctc cctgtctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg      1980
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct cctgatgca tgaggctctg      2040
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga      2088

```

<210> 302

<211> 713

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpos multiespecíficos C225v5 N297Q - OKT3m-H-C

<400> 302

```

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1              5              10              15

```

```

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
                20              25              30

```

```

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
          35              40              45

```

```

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50              55              60

```

```

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65              70              75              80

```

```

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gln Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
          85              90              95

```

```

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

```

ES 2 912 932 T3

100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350

ES 2 912 932 T3

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
 465 470 475 480
 Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala
 485 490 495
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg
 500 505 510
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly
 515 520 525
 Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr
 530 535 540
 Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 545 550 555 560
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr
 565 570 575
 Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly
 580 585 590
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile
 595 600 605

ES 2 912 932 T3

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
610 615 620

Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp
625 630 635 640

Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr
645 650 655

Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser
660 665 670

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala
675 680 685

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly
690 695 700

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
705 710

<210> 303

<211> 2142

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpos multiespecíficos C225v5 N297Q - OKT3m-H-C

<400> 303

caggtgcagc tgaacacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt	60
acctgcaccg tgagcggcct tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt gcgccagagc	120
ccgggcaaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac	180
accccggttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt	240
aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggatacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc	300
tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccg tggtagccgt gagcgcggct	360
agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720

ES 2 912 932 T3

```

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag      780
gtcacatgcg tgggtggtga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtaccagagc      900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa     1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg     1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc     1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg     1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag     1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag     1320
aagagcctct cctgtctctc gggtaaagga ggtggatctg gaggtggcgg ttcaggtctt     1380
ggcggagggc caggtggtgg aggatcaggc ggaggtcagg ttcagctgca gcagagcggc     1440
gcagaactgg cacgtccggg tgcaagcgtt aaaatgagct gtaaagcaag cggttatacc     1500
tttacccggt ataccatgca ttgggttaaa cagcgtccgg gtcaggggtc ggaatggatt     1560
ggttatatca atccgagccg tggttatacc aactacaacc agaaattcaa agataaagca     1620
accctgacca ccgataaaag cagcagcacc gcctatatgc agctgagcag cctgacctca     1680
gaggatagcg cagtttatta ctgtgcacgc tattatgatg atcactatag cctggattat     1740
tggggtcagg gcaccaccct gaccgttagc agcgggtggt gtggtagtgg tggcggtggt     1800
tcaggcgggt gcggtagcca gattgttctg acccagagtc cggcaattat gagcgcaagt     1860
ccgggtgaaa aagttaccat gacctgtagc gccagcagca gcgttagcta tatgaattgg     1920
tatcagcaga aaagcggcac cagcccgaaa cgttggattt atgataccag caaactggca     1980
agcgggtgtc cggcacattt tcgtggtagc ggtagcggca cctcatatag cctgaccatt     2040
agcggtatgg aagcagaaga tgcagcaacc tattattgtc agcagtggtc aagcaatccg     2100
tttacctttg gtagtggcac caaactggaa attaatcggt ga                        2142

```

<210> 304

<211> 261

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos activables 3954-1204-C225v5

<400> 304

```

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
1           5           10           15

```

ES 2 912 932 T3

Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Ser Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Ser Ser Gly Thr Gln
35 40 45

Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu
50 55 60

Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile
65 70 75 80

His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
85 90 95

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
100 105 110

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu
115 120 125

Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
130 135 140

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
145 150 155 160

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
165 170 175

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
180 185 190

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
195 200 205

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
210 215 220

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
225 230 235 240

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
245 250 255

Asn Arg Gly Glu Cys
260

<210> 305

<211> 1578

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpos activables 3954-1204-C225v5

<400> 305

ES 2 912 932 T3

```

caagggcagt ctggccagt catctcacct cgtggttgtc cggacggccc atacgtcatg      60
tacggctcga gcggtggcag cggtagctct ggtggatccg gtctgagcgg ccgttccgat      120
aatcatggca gtagcggtag ccagatcttg ctgaccacaga gcccggtgat tctgagcgtg      180
agcccgggcg aacgtgtgag ctttagctgc cgcgcgagcc agagcattgg caccaacatt      240
cattggtatc agcagcgcac caacggcagc ccgcgcctgc tgattaaata tgcgagcgaa      300
agcattagcg gcattccgag ccgcttttagc ggcagcggca gcggcaccga ttttaccctg      360
agcattaaca gcgtggaaag cgaagatatt gcggattatt attgccagca gaacaacaac      420
tggccgacca cctttggcgc gggcaccaaa ctggaactga aacgtacggt ggctgcacca      480
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg      540
tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtgggaagg ggataacgcc      600
ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac      660
agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc      720
tgcgaaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag      780
tgtggagggt gatctggagg tggcggttca ggctctggcg gaggctcagg tgggtggagga      840
tcaggcggag gtcaggttca gctgcagcag agcgggtcag aactggcacg tccgggtgca      900
agcgttaaaa tgagctgtaa agcaagcggg tataccttta cccgttatac catgcattgg      960
gttaaacagc gtccgggtca gggctctgaa tggattgggt atatcaatcc gagccgtggt      1020
tataccaact acaaccagaa attcaaagat aaagcaaccc tgaccaccga taaaagcagc      1080
agcaccgcct atatgcagct gagcagcctg acctcagagg atagcgcagt ttattactgt      1140
gcacgctatt atgatgatca ctatagcctg gattattggg gtcagggcac caccctgacc      1200
gttagcagcg gtggtggtgg tagtggtggc ggtggttcag gcggtggcgg tagccagatt      1260
gttctgaccc agagtccggc aattatgagc gcaagtccgg gtgaaaaagt taccatgacc      1320
tgtagcgcca gcagcagcgt tagctatatg aattggtatc agcagaaaag cggcaccagc      1380
ccgaaacggt ggatttatga taccagcaaa ctggcaagcg gtgttccggc acattttcgt      1440
ggtagcggta gcggcacctc atatagcctg accattagcg gtatggaagc agaagatgca      1500
gcaacctatt attgtcagca gtggtcaagc aatccgttta cctttggtag tggcaccaaa      1560
ctggaaatta atcgttag                                     1578

```

<210> 306

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo OKT3m scFv

<400> 306

5

10

ES 2 912 932 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
165 170 175

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
180 185 190

Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
195 200 205

Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
210 215 220

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
225 230 235 240

Arg

5 <210> 307
<211> 723
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Anticuerpo OKT3m scFv

<400> 307

ES 2 912 932 T3

```

cagggttcagc tgcagcagag cgggtgcagaa ctggcacgtc cgggtgcaag cgttaaaatg      60
agctgtaaaag caagcgggta tacctttacc cgttatacca tgcattgggt taaacagcgt      120
ccgggtcagg gtctggaatg gattgggtat atcaatccga gccgtgggta taccaactac      180
aaccagaaat tcaaagataa agcaaccctg accaccgata aaagcagcag caccgcctat      240
atgcagctga gcagcctgac ctgagaggat agcgcagttt attactgtgc acgctattat      300
gatgatcact atagcctgga ttattggggg cagggcacca ccctgaccgt tagcagcggg      360
gggtggggta gtggtggcgg tgggttcaggc ggtggcggta gccagattgt tctgaccag      420
agtccggcaa ttatgagcgc aagtccgggt gaaaaagtta ccatgacctg tagcgccagc      480
agcagcgtta gctatatgaa ttggtatcag cagaaaagcg gcaccagccc gaaacgttg      540
atztatgata ccagcaaact ggcaagcggg gttccggcac attttcgtgg tagcggtagc      600
ggcacctcat atagcctgac cattagcggg atggaagcag aagatgcagc aacctattat      660
tgtcagcagt ggtcaagcaa tccgtttacc tttggtagtg gcaccaaact ggaaattaat      720
cgt                                                                    723

```

<210> 308

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo OKT3m scFv LV

<400> 308

```

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1           5           10           15

```

```

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
          20           25           30

```

```

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
          35           40           45

```

```

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
          50           55           60

```

```

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65           70           75           80

```

```

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
          85           90           95

```

```

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
          100          105

```

<210> 309

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo OKT3m scFv LV

ES 2 912 932 T3

<400> 309

```
cagattgttc tgaccagag tccggcaatt atgagcgcaa gtccgggtga aaaagttacc      60
atgacctgta gcgccagcag cagcgtagc tatatgaatt ggtatcagca gaaaagcggc      120
accagcccga aacgttggat ttatgatacc agcaaactgg caagcgggtgt tccggcacat      180
tttcgtggta gcggtagcgg cacctcatat agcctgacca ttagcgggtat ggaagcagaa      240
gatgcagcaa cctattattg tcagcagtgg tcaagcaatc cgtttacctt tggtagtggc      300
accaaactgg aaattaatcg t                                     321
```

5

<210> 310
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Anticuerpo OKT3m scFv Hv

<400> 310

15

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1              5              10              15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
          20              25              30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35              40              45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
          50              55              60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
          85              90              95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          100              105              110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
          115
```

20

<210> 311
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Anticuerpo OKT3m scFv Hv

<400> 311

ES 2 912 932 T3

	cagggttcagc tgcagcagag cgggtgcagaa ctggcacgtc cgggtgcaag cgttaaaatg	60
	agctgtaaaag caagcgggta tacctttacc cgttatacca tgcattgggt taaacagcgt	120
	ccgggtcagg gtctggaatg gattgggtat atcaatccga gccgtgggta taccaactac	180
	aaccagaaat tcaaagataa agcaaccctg accaccgata aaagcagcag caccgcctat	240
	atgcagctga gcagcctgac ctcagaggat agcgcagttt attactgtgc acgctattat	300
	gatgatcact atagcctgga ttattggggg cagggcacca ccctgaccgt tagcagc	357
5	<210> 312 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> secuencia escindible <400> 312	
	Arg Pro Ser Pro Met Trp Ala Tyr 1 5	
15	<210> 313 <211> 645 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> CADENA LIGERA C225v5 <400> 313	
	cagatcttgc tgacccagag cccgggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga acgtgtgagc	60
	tttagctgcc gcgcgagcca gagcattggc accaacattc attggtatca gcagcgcacc	120
	aacggcagcc cgcgcctgct gattaaatat gcgagcgaaa gcattagcgg cattccgagc	180
	cgcttttagcg gcagcggcag cggcacccgat tttaccctga gcattaacag cgtggaaagc	240
	gaagatattg cggattatta ttgccagcag aacaacaact ggccgaccac ctttggcgcg	300
	ggcaccaaac tggaactgaa acgtacgggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc	360
	tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
	cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag	480
	gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
	ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
25	ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag	645
30	<210> 314 <211> 214 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Anticuerpo multiespecifico activable 3954-1204-C225v5-OKT3m-H-N	
35	<400> 314	

ES 2 912 932 T3

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5 <210> 315
 <211> 1437
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Anticuerpo multiespecifico activable 3954-1204-C225v5-OXT3m-H-N
 <400> 315

ES 2 912 932 T3

gacatcttgc tgaccagag ccggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga acgtgtgagc 60
 tttagctgcc gcgcgagcca gagcattggc accaacattc attggtatca gcagcgcacc 120
 aacggcagcc cgcgcctgct gattaaatat gcgagcgaaa gcattagcgg cattccgagc 180
 cgcttttagcg gcagcggcag cggcaccgat tttaccctga gcattaacag cgtggaaagc 240
 gaagatattg cggattatta ttgccagcag aacaacaact ggccgaccac ctttggcgcg 300
 ggcaccaaac tggaaactgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 ccagagaggg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtggagggtg atctggaggt 660
 ggcgggttcag gctctggcgg aggctcaggt ggtggaggat caggcggagg tcagggttcag 720
 ctgcagcaga gcggtgcaga actggcacgt ccgggtgcaa gcgttaaaat gagctgtaaa 780
 gcaagcgggtt atacctttac ccgttatacc atgcattggg ttaaacagcg tccgggtcag 840
 ggtctggaat ggattggtta tatcaatccg agccgtggtt ataccaacta caaccagaaa 900
 ttcaaagata aagcaaccct gaccaccgat aaaagcagca gcaccgccta tatgcagctg 960
 agcagcctga cctcagagga tagcgcagtt tattactgtg cacgctatta tgatgatcac 1020
 tatagcctgg attattgggg tcagggcacc accctgaccg ttagcagcgg tgggtggtggt 1080
 agtgggtggcg gtggttcagg cgggtggcgt agccagattg ttctgacca gagtccggca 1140
 attatgagcg caagtccggg tgaaaaagtt accatgacct gtagcgccag cagcagcgtt 1200
 agctatatga attggtatca gcagaaaagc ggcaccagcc cgaaacggtg gatttatgat 1260
 accagcaaac tggcaagcgg tgttccggca cattttcgtg gtagcggtag cggcacctca 1320
 tatagcctga ccattagcgg tatggaagca gaagatgcag caacctatta ttgtcagcag 1380
 tgggtcaagca atccggtttac ctttggtagt ggcaccaaac tggaaattaa tcgttag 1437

5 <210> 316
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia escindible
 <400> 316

15 Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Ser
 1 5

20 <210> 317
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia escindible

25 <400> 317

ES 2 912 932 T3

		Gln Asn Gln Ala Leu Arg Met Ala
		1 5
5	<210> 318	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> secuencia escindible	
		<400> 318
		Ala Gln Asn Leu Leu Gly Met Val
		1 5
15	<210> 319	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> secuencia escindible	
	<400> 319	
		Ser Thr Phe Pro Phe Gly Met Phe
25		1 5
	<210> 320	
	<211> 8	
	<212> PRT	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia escindible	
35	<400> 320	
		Pro Val Gly Tyr Thr Ser Ser Leu
		1 5
40	<210> 321	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> secuencia escindible	
	<400> 321	
		Asp Trp Leu Tyr Trp Pro Gly Ile
50		1 5
	<210> 322	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> secuencia escindible	
	<400> 322	
60		

ES 2 912 932 T3

		Met Ile Ala Pro Val Ala Tyr Arg
		1 5
5	<210> 323 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> secuencia escindible <400> 323	
		Trp Ala Thr Pro Arg Pro Met Arg
		1 5
15	<210> 324 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> secuencia escindible <400> 324	
		Phe Arg Leu Leu Asp Trp Gln Trp
		1 5
25	<210> 325 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> secuencia escindible <400> 325	
35		Leu Lys Ala Ala Pro Arg Trp Ala
		1 5
40	<210> 326 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> secuencia escindible <400> 326	
		Gly Pro Ser His Leu Val Leu Thr
		1 5
50	<210> 327 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> secuencia escindible <400> 327	
60		Leu Pro Gly Gly Leu Ser Pro Trp
		1 5

ES 2 912 932 T3

5	<210> 328 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible	
10	<400> 328	Met Gly Leu Phe Ser Glu Ala Gly 1 5
15	<210> 329 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible	
20	<400> 329	Ser Pro Leu Pro Leu Arg Val Pro 1 5
25	<210> 330 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible	
30	<400> 330	Arg Met His Leu Arg Ser Leu Gly 1 5
35	<210> 331 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible	
40	<400> 331	Leu Ala Ala Pro Leu Gly Leu Leu 1 5
45	<210> 332 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible	
50	<400> 332	Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro 1 5
55	<210> 333 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> secuencia escindible	
60	<400> 333	Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro 1 5

ES 2 912 932 T3

<210> 333
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia escindible
 <400> 333
 10
 Leu Leu Ala Pro Ser His Arg Ala
 1 5
 <210> 334
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> secuencia escindible
 20
 <400> 334
 Pro Ala Gly Leu Trp Leu Asp Pro
 1 5
 25
 <210> 335
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> secuencia escindible
 <400> 335
 35
 Ile Ser Ser Gly Leu Ser Ser
 1 5
 <210> 336
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cadena pesada de anticuerpo C225v5 N297Q
 45
 <400> 336

ES 2 912 932 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr	20	25	30	
Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	35	40	45	
Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	50	55	60	
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe	65	70	75	80
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Arg	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240

ES 2 912 932 T3

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 337

<211> 1350

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo C225v5 N297Q

<400> 337

ES 2 912 932 T3

```

caggtgcagc tgaacacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt      60
acctgcaccg tgagcggcctt tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt ggcgcagagc      120
ccgggcaaaag gcctggaatg gctggggcgtg atttgagcgc gcggcaacac cgattataac      180
accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gaaaagcca ggtgtttttt      240
aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggataacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc      300
tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccg tggtgaccgt gagcgcggct      360
agcaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc      420
acagcggccc tgggtgcctt ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg      480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga      540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac      600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaa      660
tcttgtagca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg      720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag      780
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtaccagagc      900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc a tcgagaaaac catctccaaa     1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg     1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc     1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg     1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag     1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag     1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga                                         1350

```

<210> 338

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 338

Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Asn	Ile	Trp	Leu	Val	Gly	Gly	Asp	Cys
1				5					10					15	

Arg	Gly	Trp	Gln	Gly
			20	

<210> 339

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 339

ES 2 912 932 T3

Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys
1				5		

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo activable biespecífico, donde dicho anticuerpo activable biespecífico comprende:

(i) un primer brazo que comprende un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de acoplamiento de células efectoras inmunitarias que incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB1) que se une a una primera diana de células efectoras inmunitarias;

(ii) un segundo brazo que comprende un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de unión a la diana que incluye un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (AB2) que se une a una segunda diana;

donde el AB1 está unido a un primer resto de enmascaramiento (MM1) de modo que el acoplamiento del MM1 al AB1 reduce la capacidad del AB1 de unirse a la primera diana,

donde el MM1 está acoplado al AB1 a través de una primera secuencia de resto escindible (CM1) que incluye un sustrato para una proteasa;

donde el AB2 está unido a un segundo resto de enmascaramiento (MM2) de modo que el acoplamiento del MM2 al AB2 reduce la capacidad del AB2 de unirse a la segunda diana;

donde el MM2 está acoplado al AB2 a través de una segunda secuencia de resto escindible (CM2) que incluye un sustrato para una proteasa; y

donde el primer brazo del anticuerpo activable biespecífico en un estado no escindido tiene la disposición estructural desde el extremo N hasta el extremo C de la siguiente manera: MM1-CM1-AB1 y el segundo brazo del anticuerpo activable biespecífico en el estado no escindido tiene una disposición estructural desde el extremo N hasta el extremo C de la siguiente manera: MM2-CM2-AB2.

2. El anticuerpo activable biespecífico de la reivindicación 1, donde la segunda diana comprende una diana relacionada con el cáncer donde la diana relacionada con el cáncer es una diana tumoral, opcionalmente un tumor sólido.

3. El anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el AB1 es:

un anticuerpo de acoplamiento de células efectoras inmunitarias;

un anticuerpo de acoplamiento de leucocitos;

un anticuerpo de acoplamiento de células T;

un anticuerpo de acoplamiento de células NK;

un anticuerpo de acoplamiento de macrófagos; o

un anticuerpo de acoplamiento de células mononucleares.

4. El anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo de acoplamiento de células efectoras inmunitarias es un anticuerpo de acoplamiento de células T, y donde la primera diana de células efectoras inmunitarias es una diana de células T.

5. El anticuerpo activable biespecífico de la reivindicación 4, donde la diana de células T es CD3 o CTLA-4.

6. El anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la segunda diana se selecciona de entre el grupo de dianas de la Tabla 1, opcionalmente donde la segunda diana es Jagged o EGFR.

7. El anticuerpo activable biespecífico de la reivindicación 4, donde la diana de células T es CD3 y la segunda diana es EGFR.

8. El anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:

el primer brazo

comprende un péptido de unión entre el MM1 y el CM1; o

comprende un péptido de unión entre el CM1 y el AB1; o

comprende un primer péptido de unión (LP1) y un segundo péptido de unión (LP2), donde el anticuerpo activable biespecífico en el estado no escindido tiene una disposición estructural del extremo N-terminal al extremo C-terminal de la siguiente manera: MM1-LP1-CM1-LP2-AB, opcionalmente donde los dos péptidos de unión no son idénticos entre sí; o

el CM1 del primer brazo se coloca en el anticuerpo activable biespecífico de modo que, en un estado no escindido, el MM1 interfiere con la unión específica del AB1 a la primera diana.

9. El anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:

el MM1 tiene una constante de disociación de equilibrio para la unión al AB1 que es mayor que la constante de disociación de equilibrio del AB1 a su diana;

el MM1 no interfiere ni compite con el AB1 por unirse a la primera diana cuando el anticuerpo activable biespecífico está en un estado escindido;

la secuencia de polipéptidos MM1 es diferente de la de la primera diana;

la secuencia de polipéptidos MM1 no es más de un 50 % idéntica a cualquier pareja de unión natural del AB1; y/o

el MM1 es un polipéptido de no más de 40 aminoácidos de longitud.

10. El anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:

el segundo brazo

comprende un péptido de unión entre el MM2 y el CM2; o

comprende un péptido de unión entre el CM2 y el AB2; o

comprende un primer péptido de unión (LP1) y un segundo péptido de unión (LP2), donde el anticuerpo activable biespecífico en el estado no escindido tiene una disposición estructural del extremo N al extremo C de la siguiente manera: MM2-LP1-CM2-LP2-AB2, opcionalmente donde los dos péptidos de unión no son idénticos entre sí; o

el CM2 del segundo brazo se coloca en el anticuerpo activable biespecífico de modo que, en un estado no escindido, el MM2 interfiere con la unión específica del AB2 a la segunda diana.

11. El anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:

el MM2 tiene una constante de disociación de equilibrio para unirse al AB2 que es mayor que la constante de disociación de equilibrio del AB2 a su diana;

el MM2 no interfiere ni compite con el AB2 por unirse a la segunda diana cuando el anticuerpo activable biespecífico está en un estado escindido;

la secuencia de polipéptidos MM2 es diferente de la de la segunda diana;

la secuencia de polipéptidos MM2 no es más de un 50 % idéntica a cualquier pareja de unión natural del AB2; y/o

el MM2 es un polipéptido de no más de 40 aminoácidos de longitud.

12. El anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el fragmento de unión al antígeno del mismo de AB1 y/o AB2 se selecciona de entre el grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un scFv, un scAb, un dAb, un anticuerpo de cadena pesada de dominio simple y un anticuerpo de cadena ligera de dominio simple.

13. El anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un agente conjugado con el anticuerpo, opcionalmente donde el agente es un agente terapéutico, un agente antineoplásico, una toxina o fragmento del mismo, un resto detectable o un agente de diagnóstico, opcionalmente donde el agente se conjuga con el anticuerpo mediante un enlazador, opcionalmente donde el enlazador es un enlazador escindible o un enlazador no escindible.

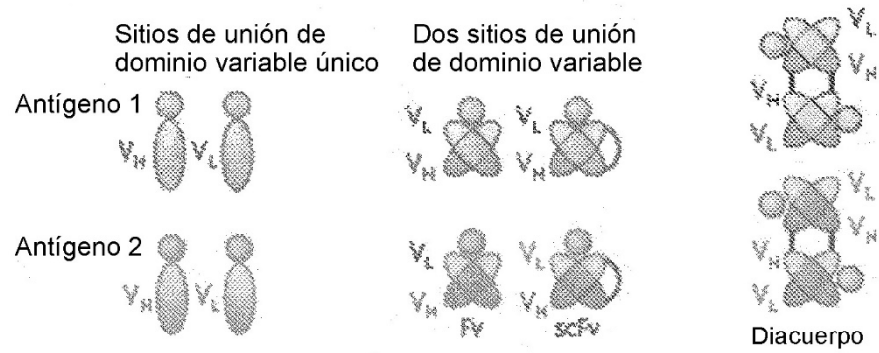
14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo.

15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14 que comprende un agente adicional; opcionalmente donde el agente adicional es un agente terapéutico.
- 5 16. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
17. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 16.
- 10 18. Un procedimiento para producir un anticuerpo activable biespecífico mediante el cultivo de una célula en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo activable biespecífico, donde la célula comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 16 o el vector de la reivindicación 17; conjugando opcionalmente un agente al anticuerpo activable biespecífico.
- 15 19. Un procedimiento de fabricación del anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el procedimiento comprende:
 - (a) cultivar una célula que comprende una construcción de ácido nucleico que codifica el anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y
 - 20 (b) recuperar el anticuerpo activable biespecífico; conjugando opcionalmente un agente al anticuerpo activable recuperado.
- 25 20. Un anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, o el anticuerpo activable biespecífico producido por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, para su uso como un medicamento.
- 30 21. El anticuerpo activable biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, o el anticuerpo activable biespecífico producido mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, para su uso en el alivio de un síntoma de una indicación clínica asociada con un trastorno en un sujeto, donde el anticuerpo activable biespecífico se administra a un sujeto que lo necesita en una cantidad suficiente para aliviar el síntoma de la indicación clínica asociada con el trastorno, opcionalmente donde dicho sujeto es un ser humano, opcionalmente donde el trastorno es cáncer
- 35

FIGURA 1

De Chan y Carter, *Nat Rev. Immunol.* 2010

Bloques de construcción de unión al antígeno:



Fragmentos de anticuerpos biespecíficos

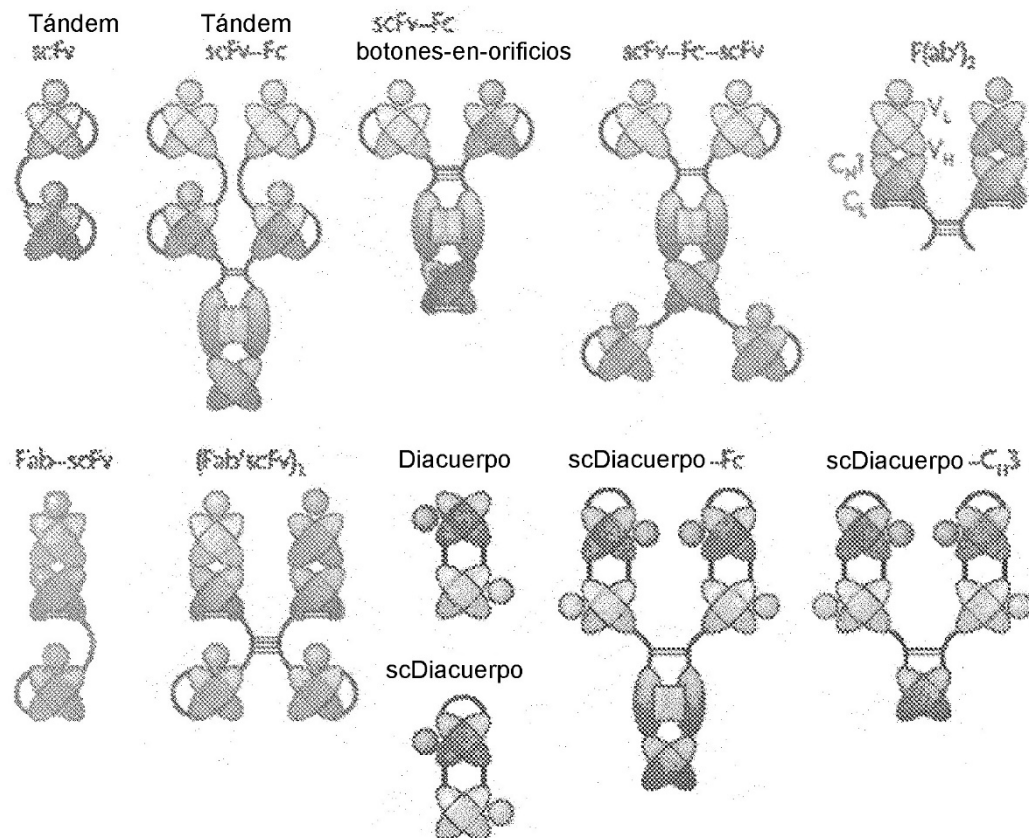


FIGURA 1, continuación

Anticuerpos biespecíficos a base de IgG

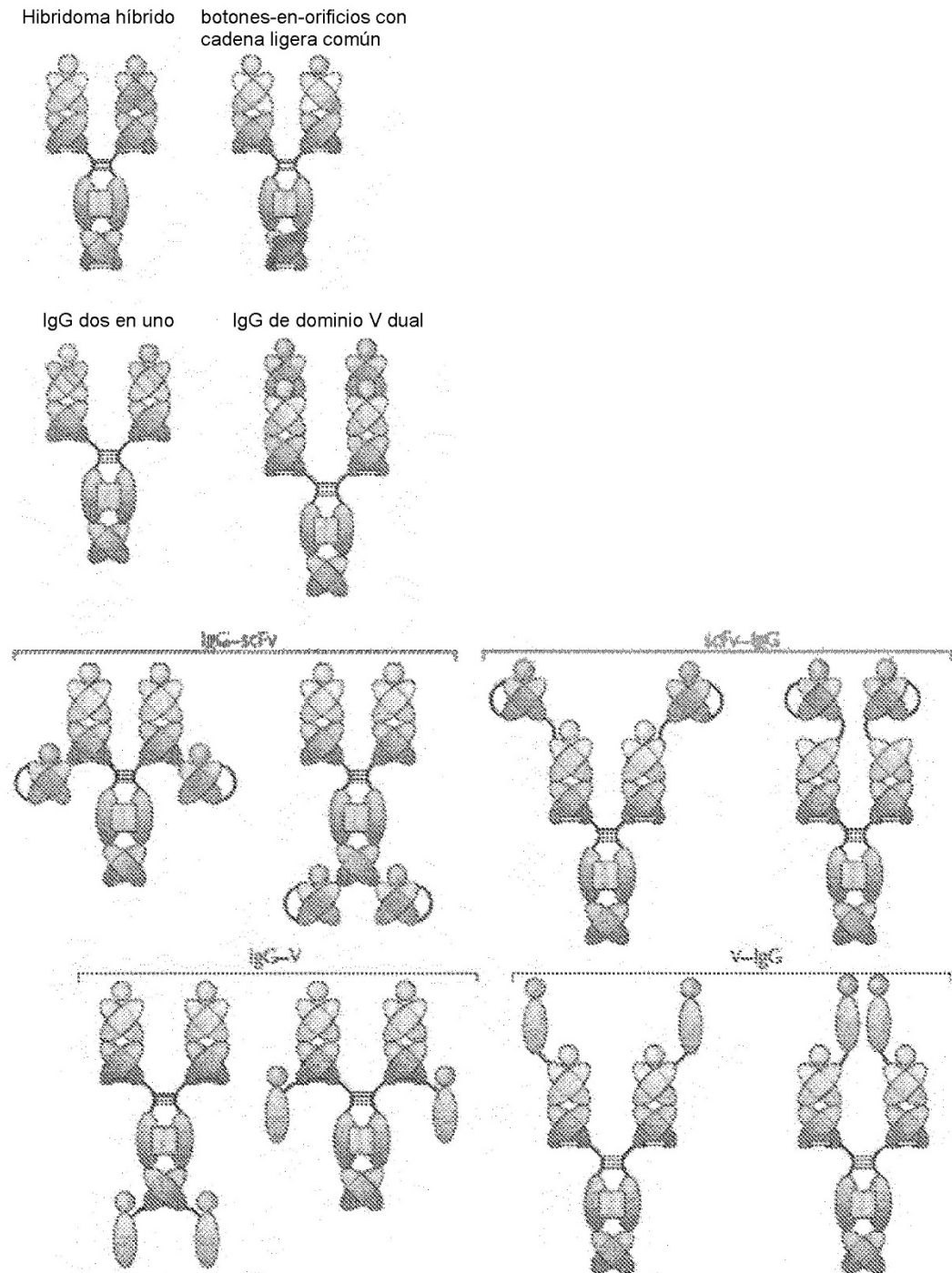


FIGURA 2

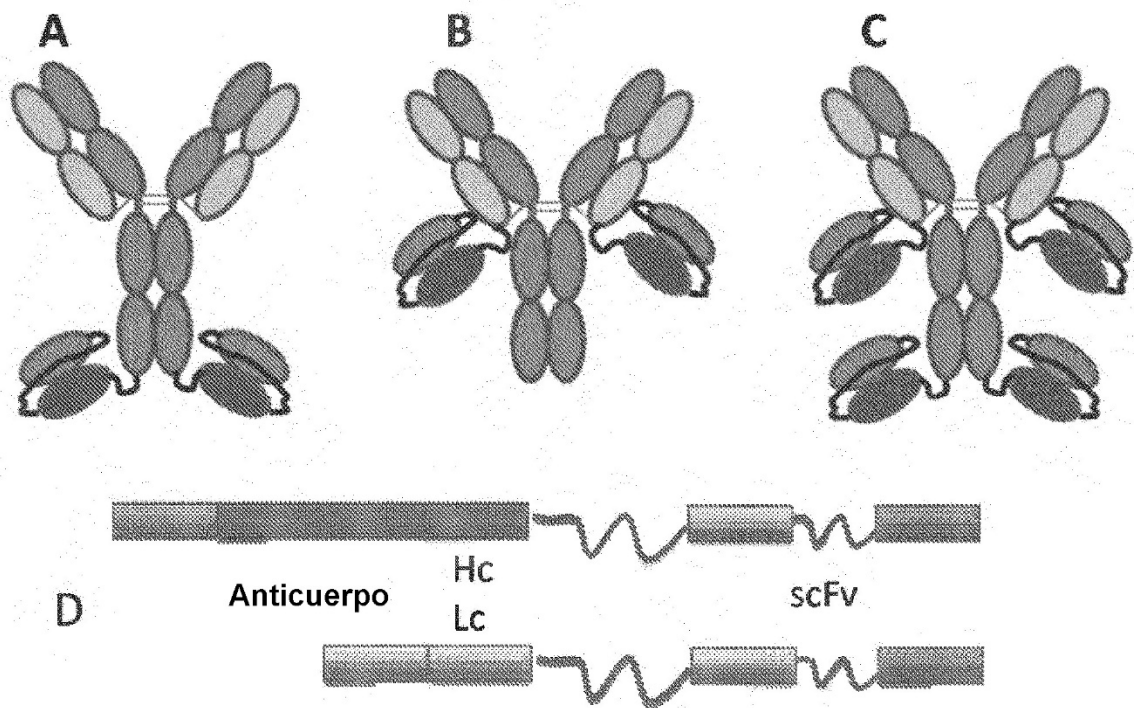


FIGURA 3A

Matrices de anticuerpos activables multiespecíficos:

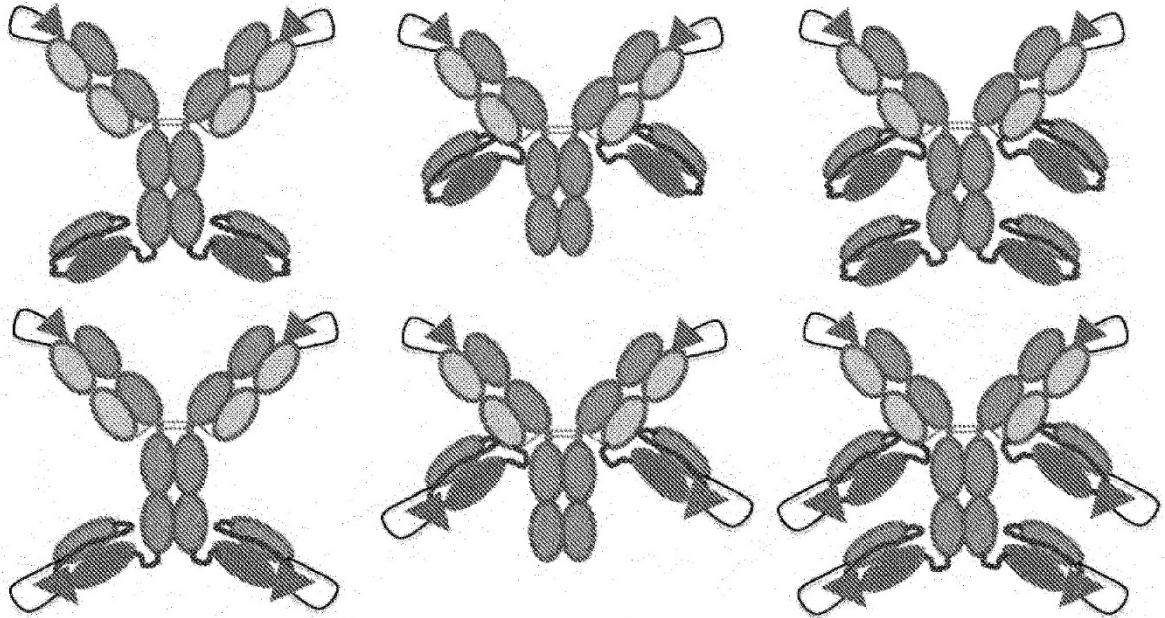


FIGURA 3B

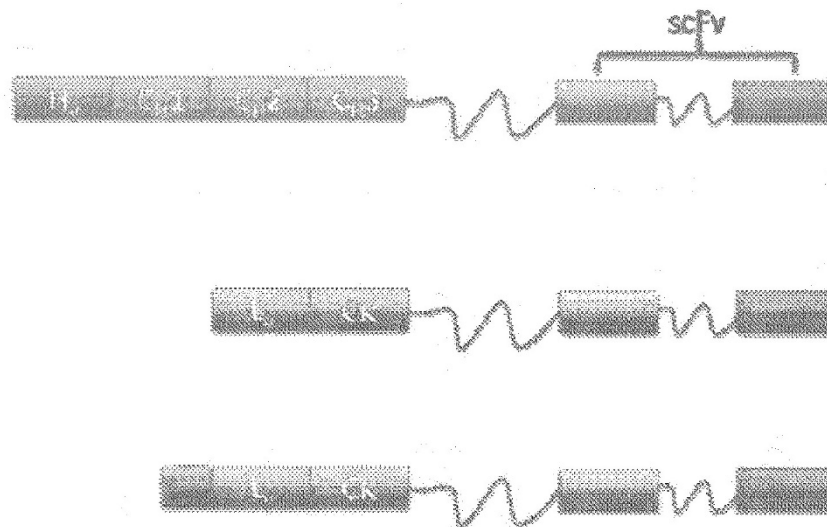


FIGURA 4

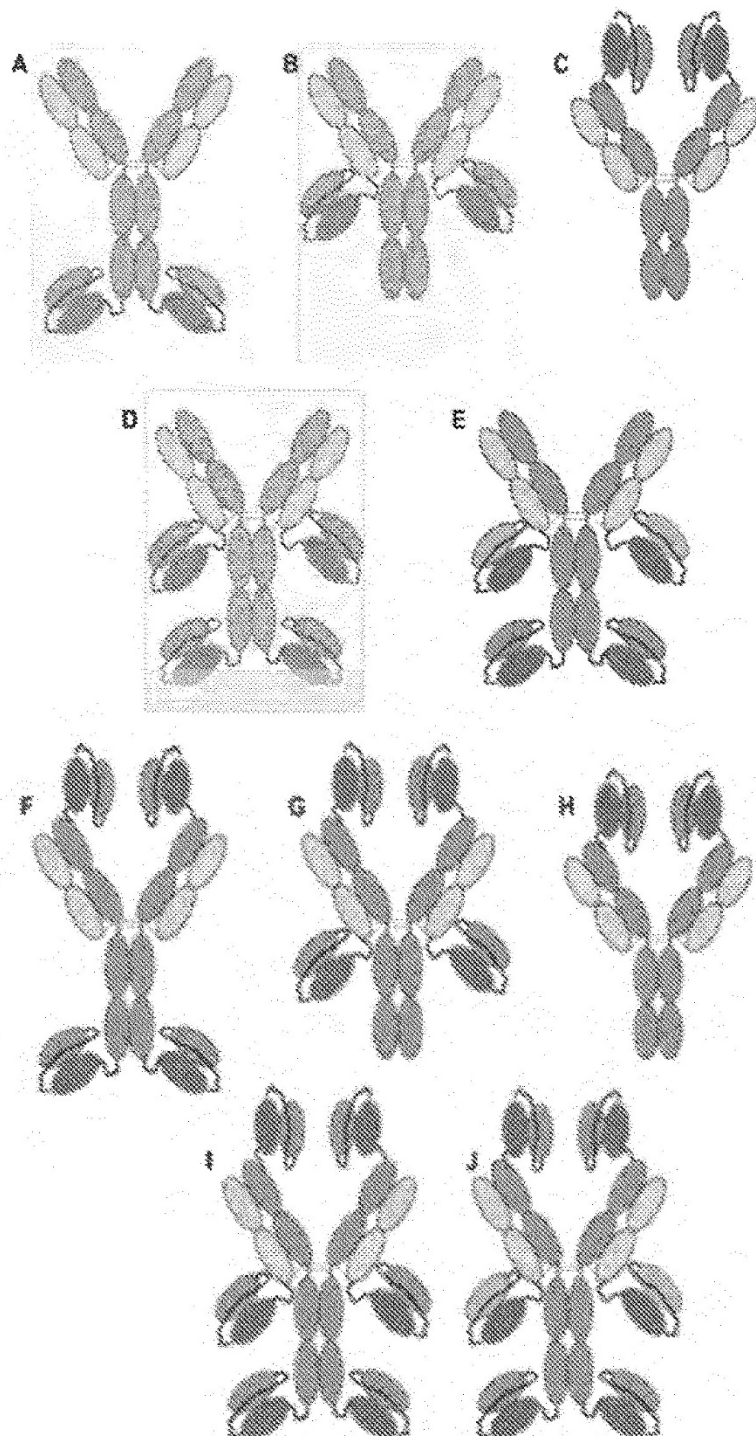


FIGURA 5

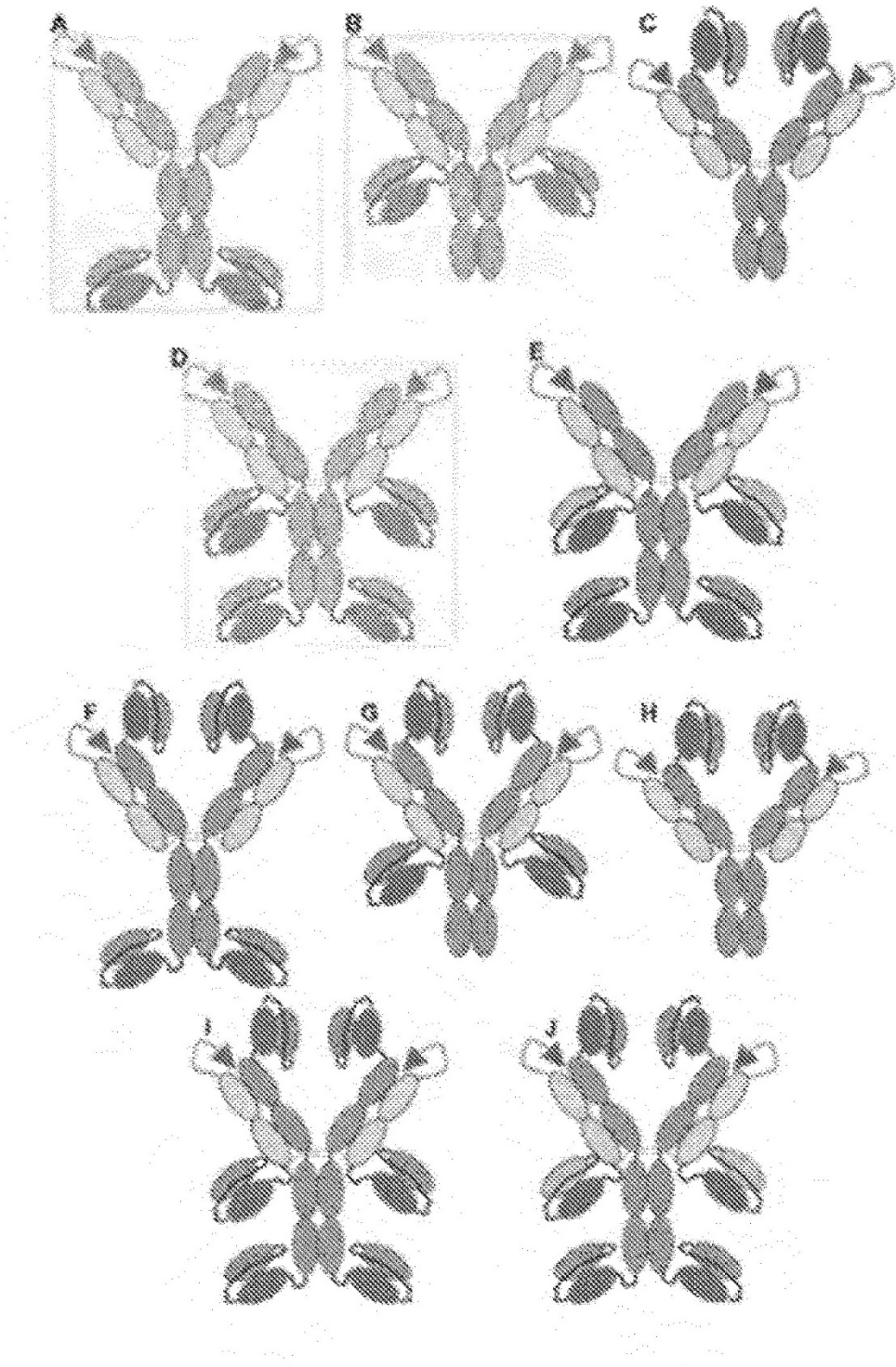


FIGURA 6

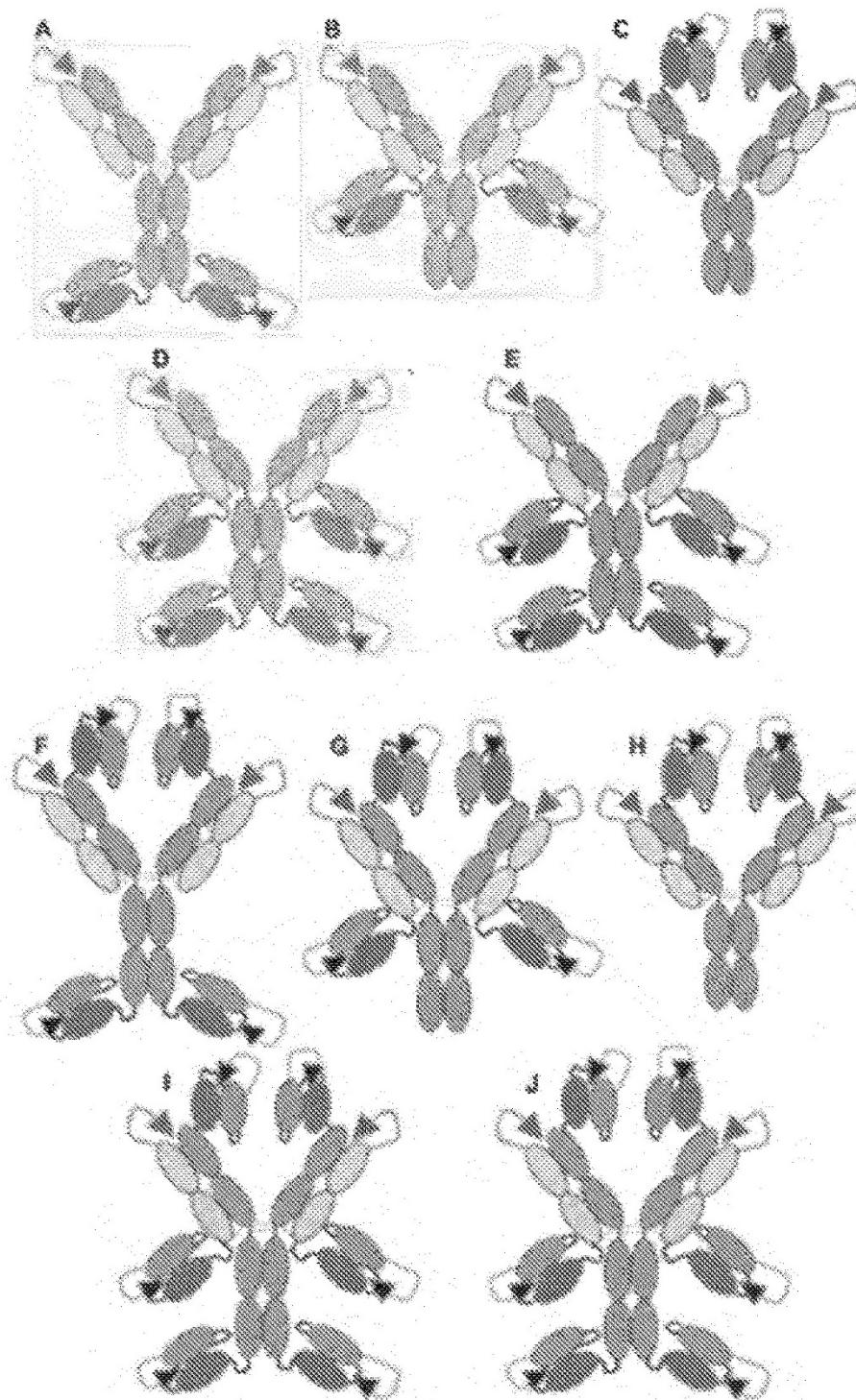


FIGURA 7

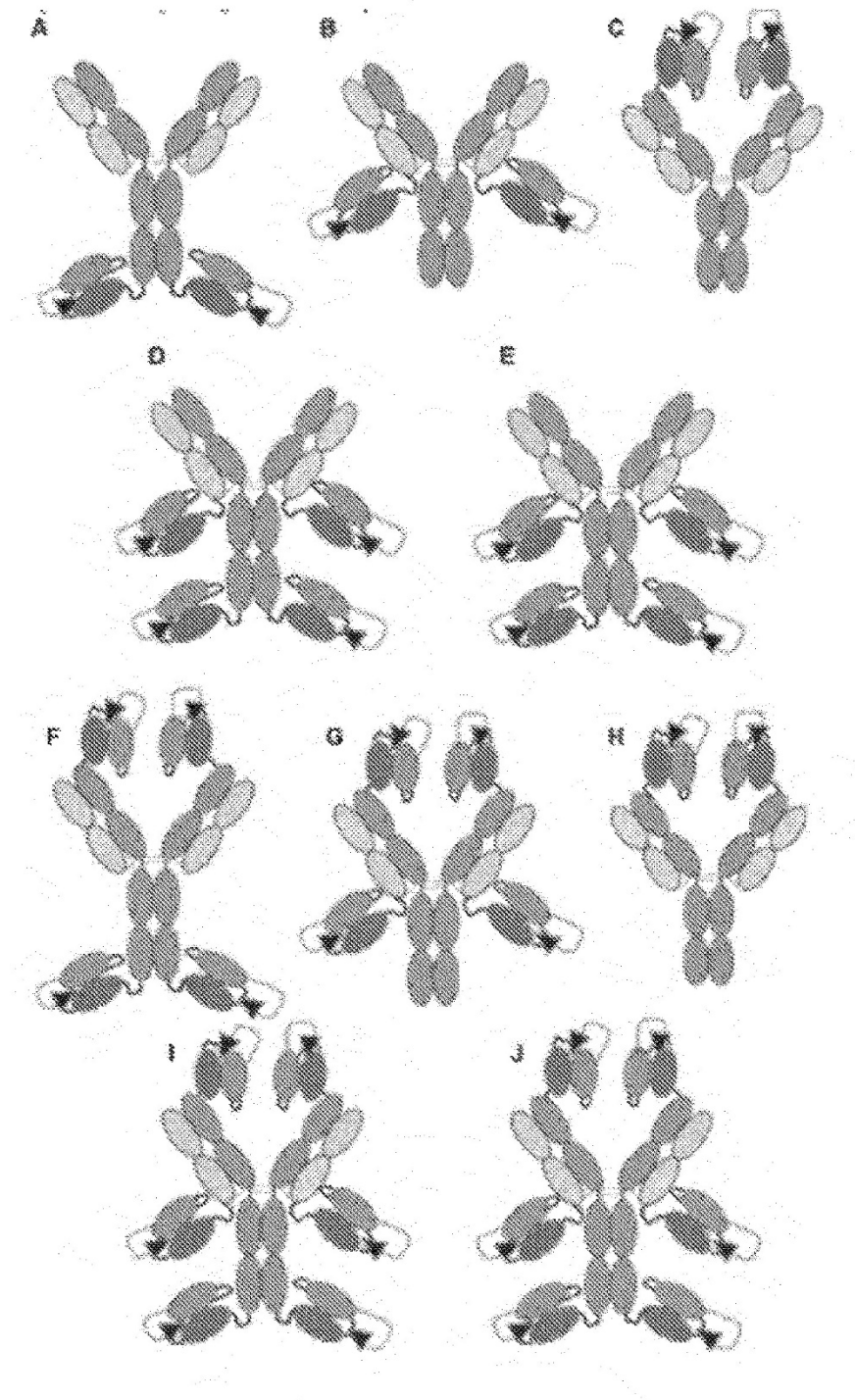


FIGURA 8

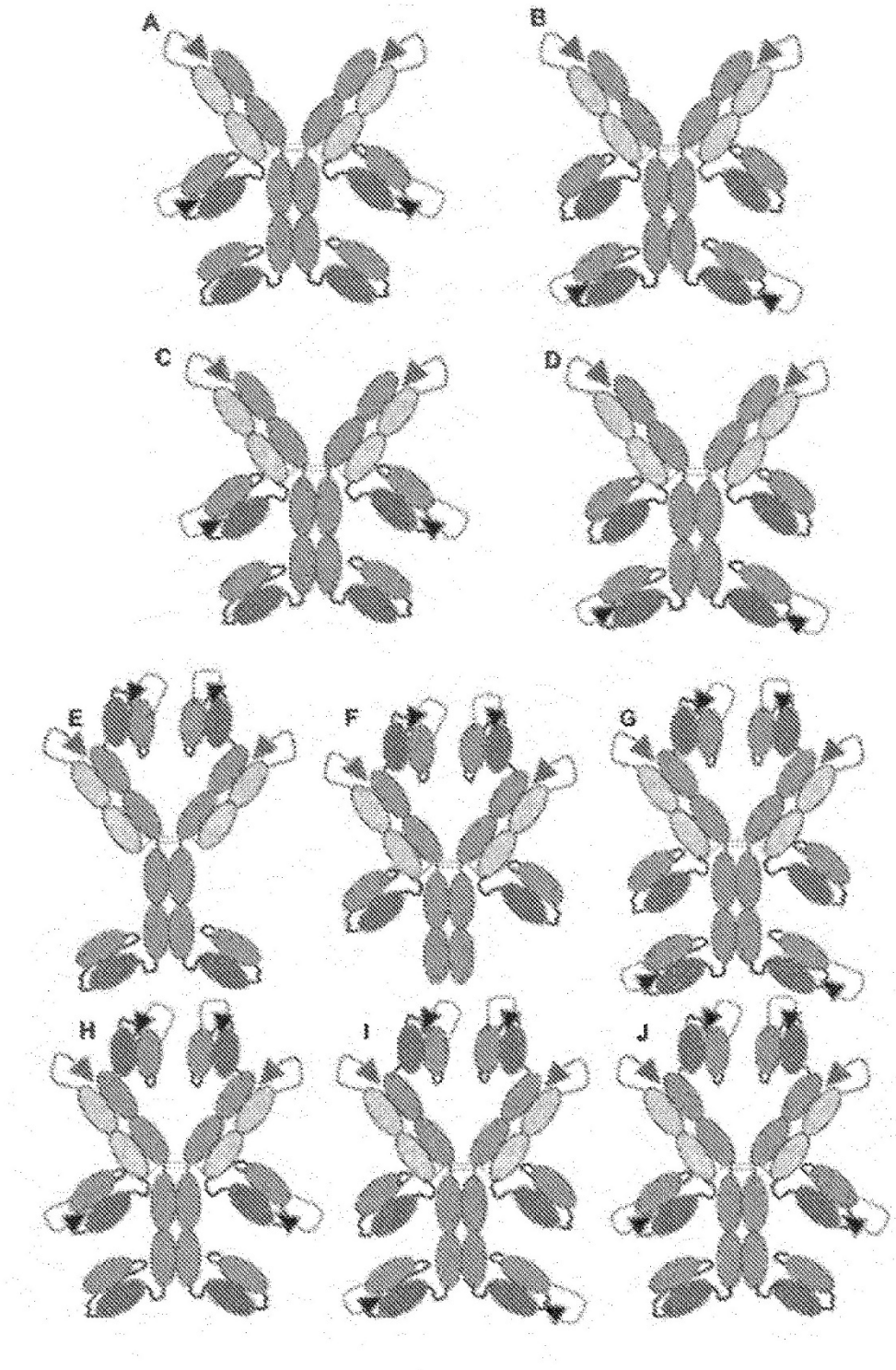


FIGURA 9

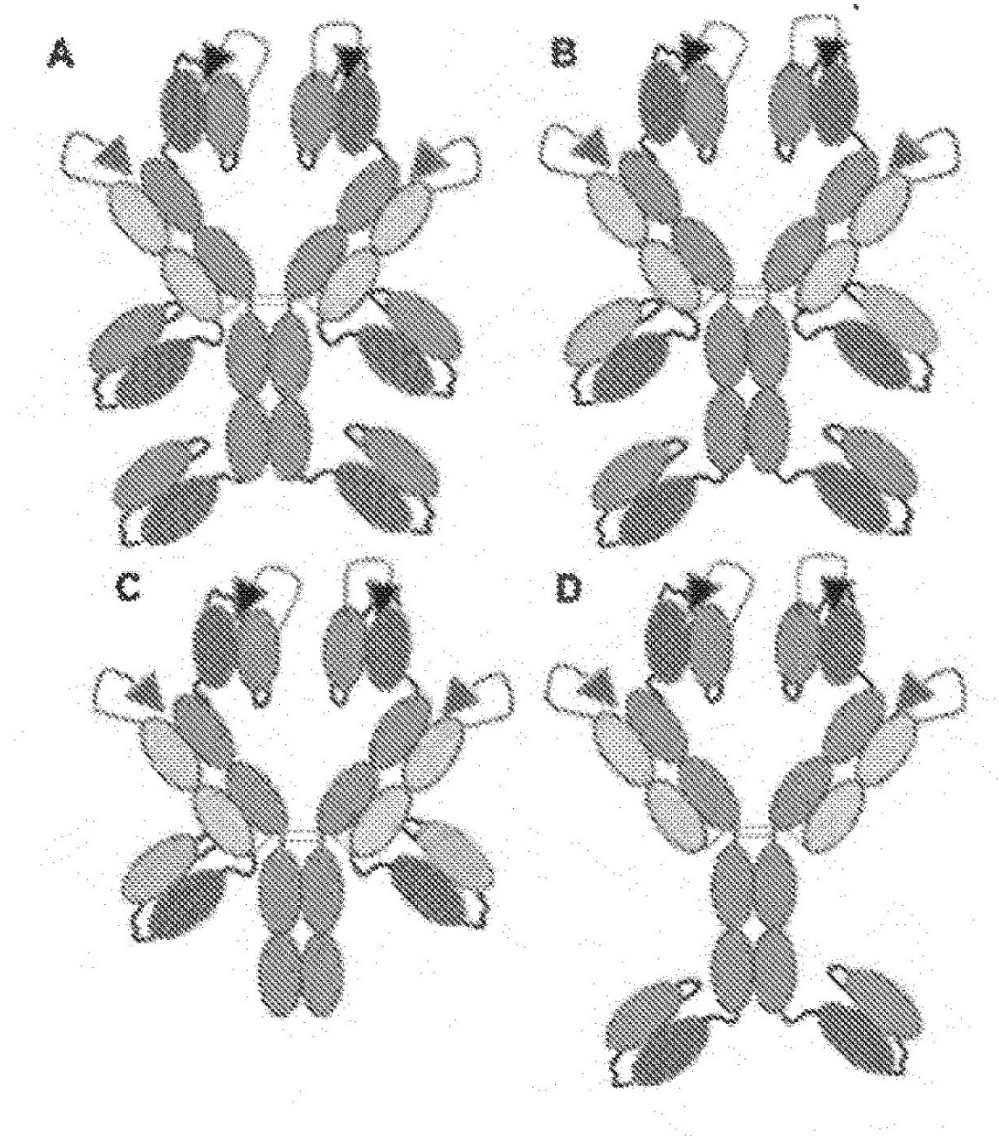
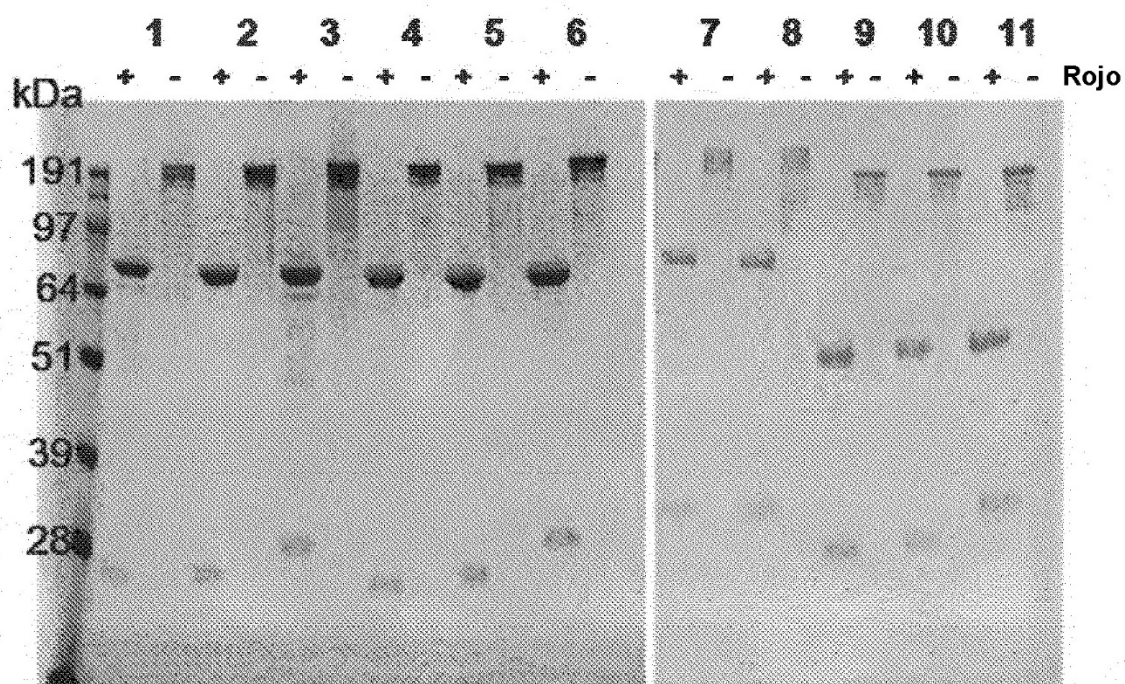


FIGURA 10



Carril	Nombre	Monómero %
1	4D11v2 OKT3	70,1%
2	C225v5 OKT3	68,0%
3	3954-1204-C225v5-OKT3	67,9%
4	4D11v2 CTLA4	100%
5	C225v5 CTLA4	100%
6	3954-1204-C225v5 CTLA4	100%
7	3954-1204-C225v5 CTLA4	100%
8	3954-1204-C225v5 OKT3	66,0%
9	Anticuerpo	
10	Anticuerpo	
11	Anticuerpo activable	

FIGURA 11

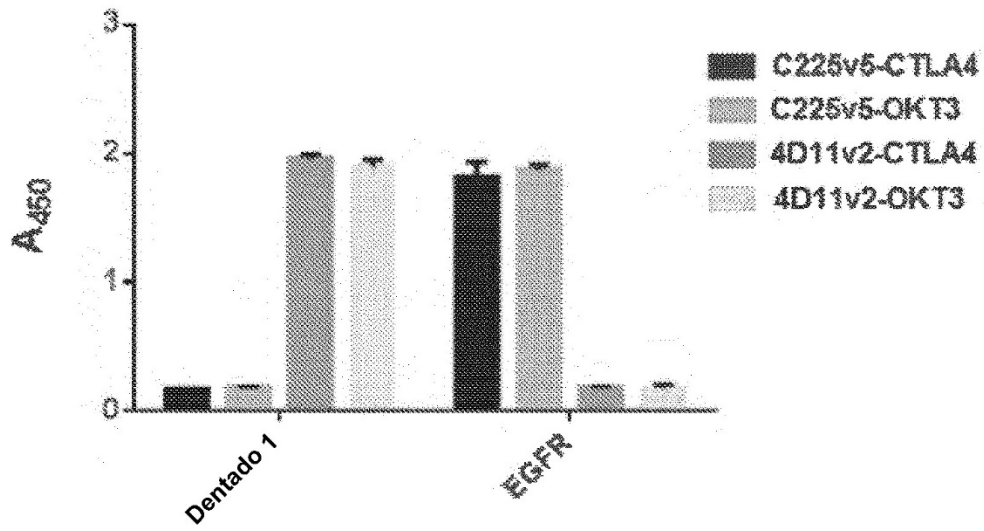


FIGURA 12A

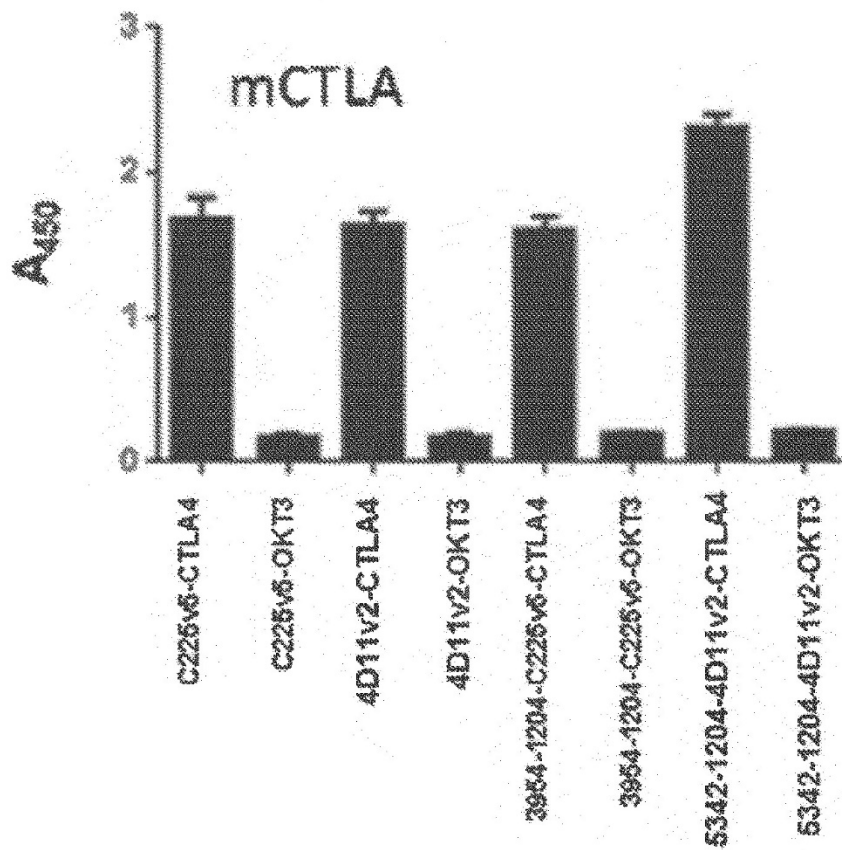


FIGURA 12B

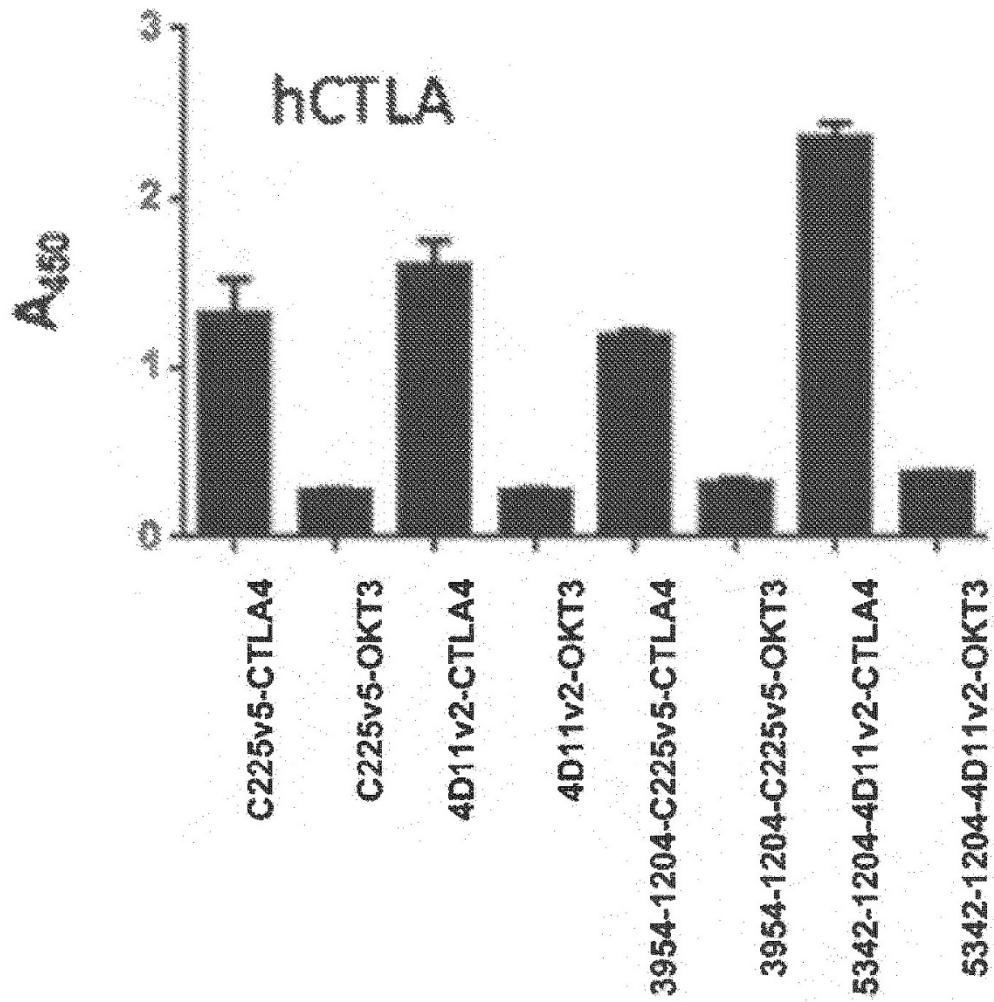


FIGURA 13

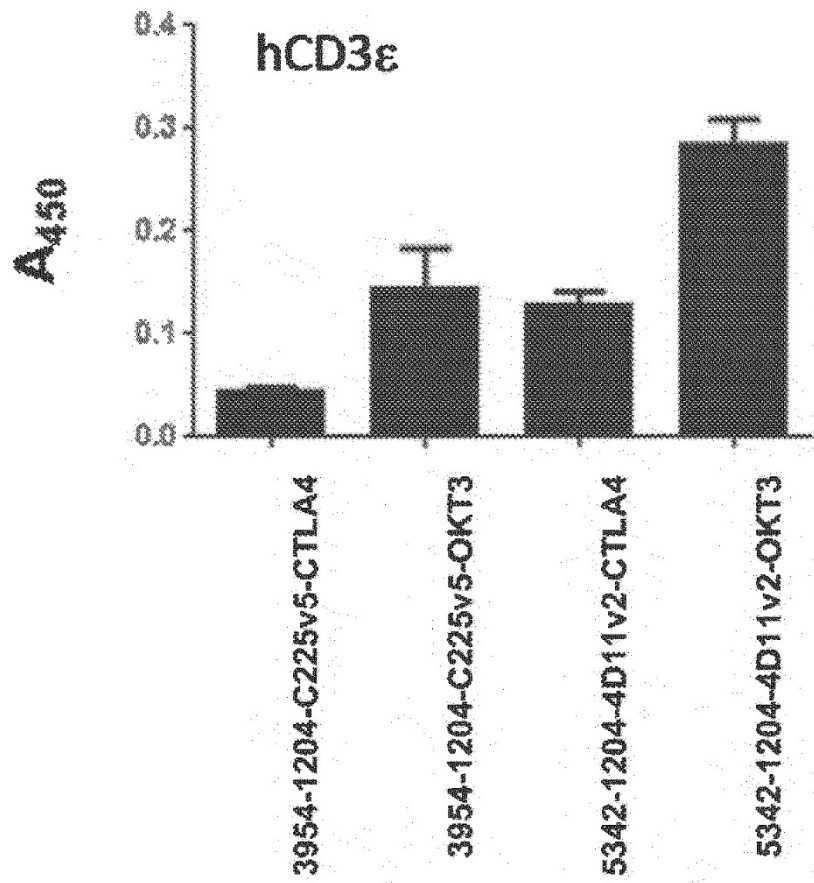


FIGURA 14

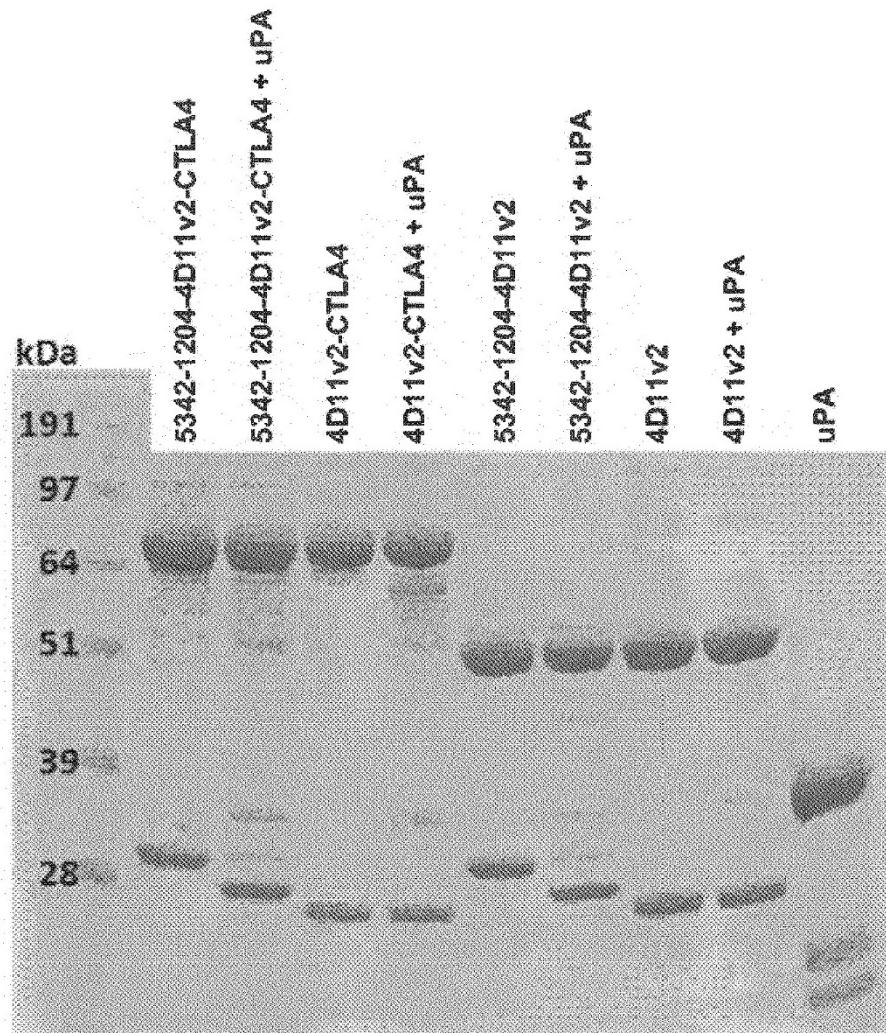


FIGURA 14, continuación

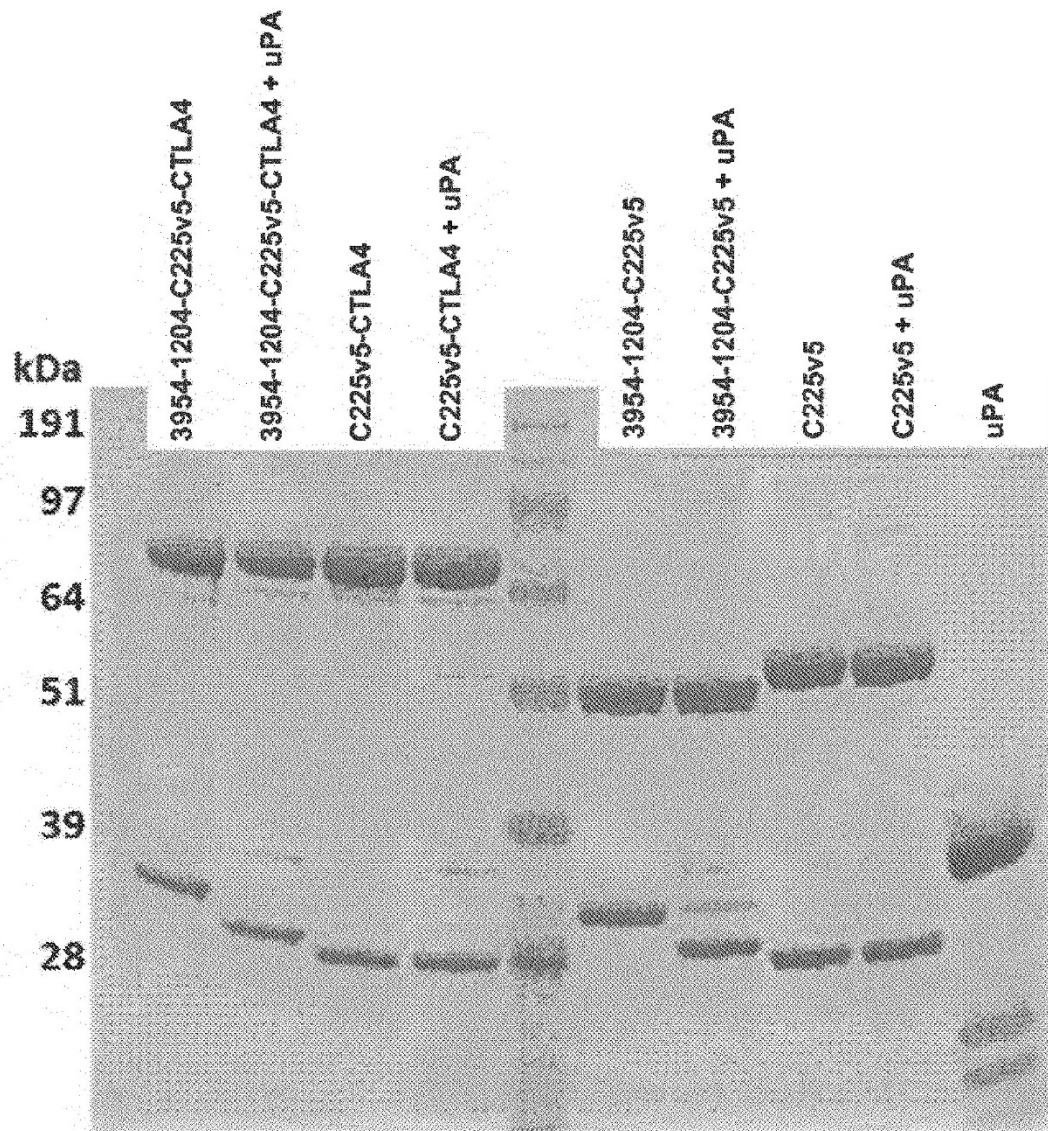


FIGURA 15A

Unión a EGFR

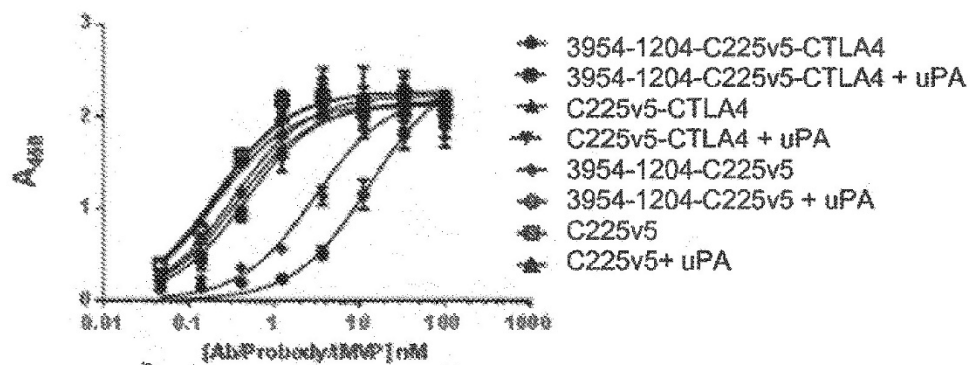


FIGURA 15B

Unión a CTLA4

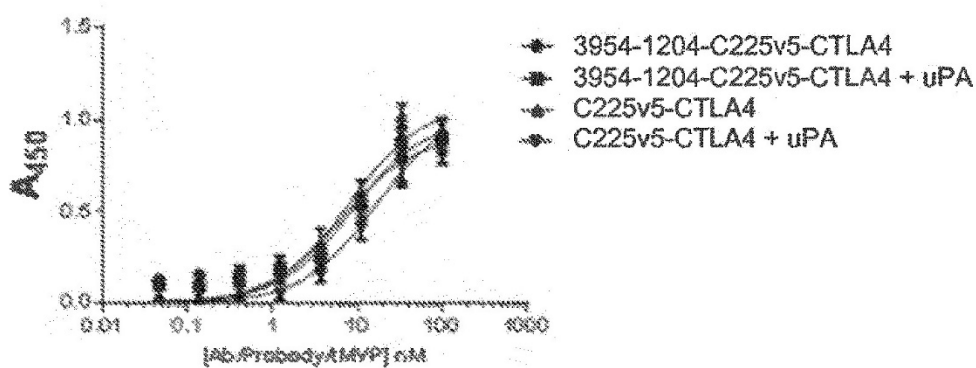


FIGURA 15C

Unión dentada

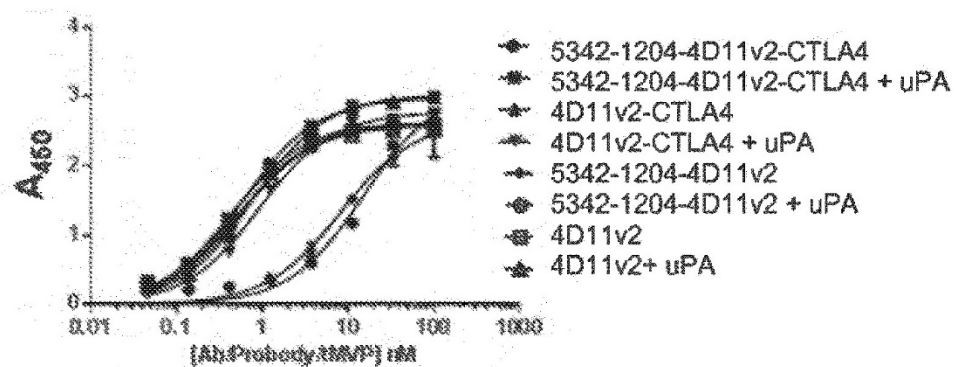


FIGURA 15D

Unión a CTLA4

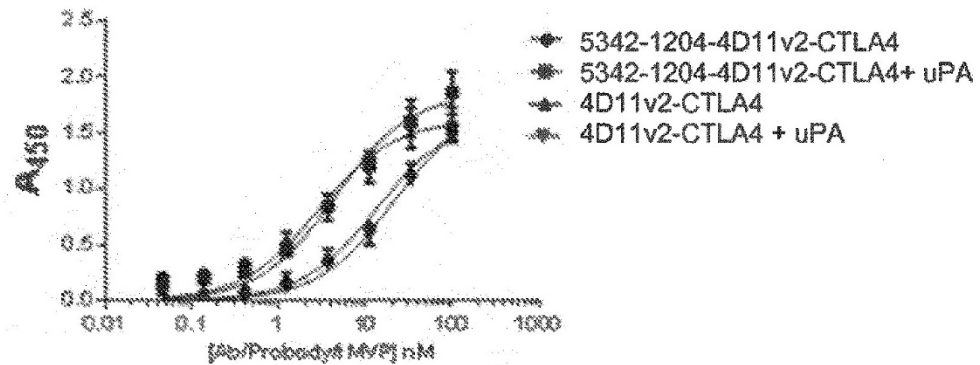


FIGURA 16A

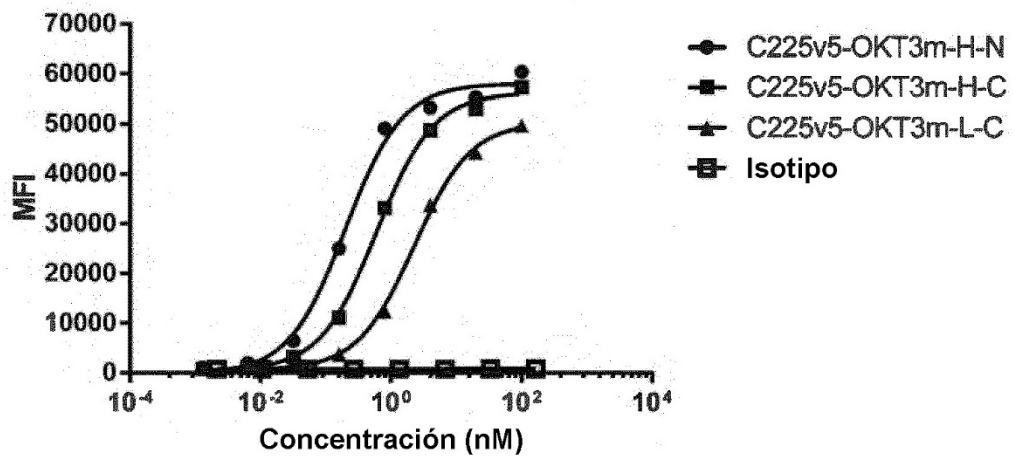


FIGURA 16B

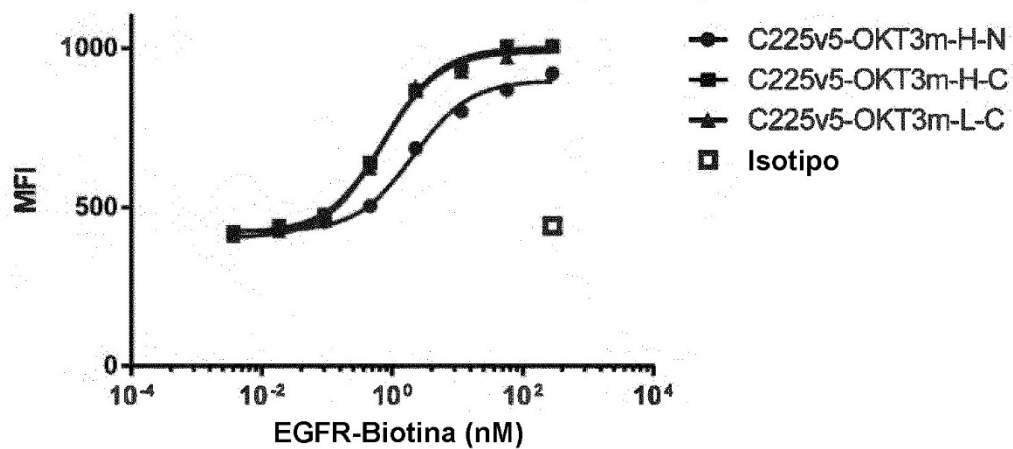


FIGURA 17

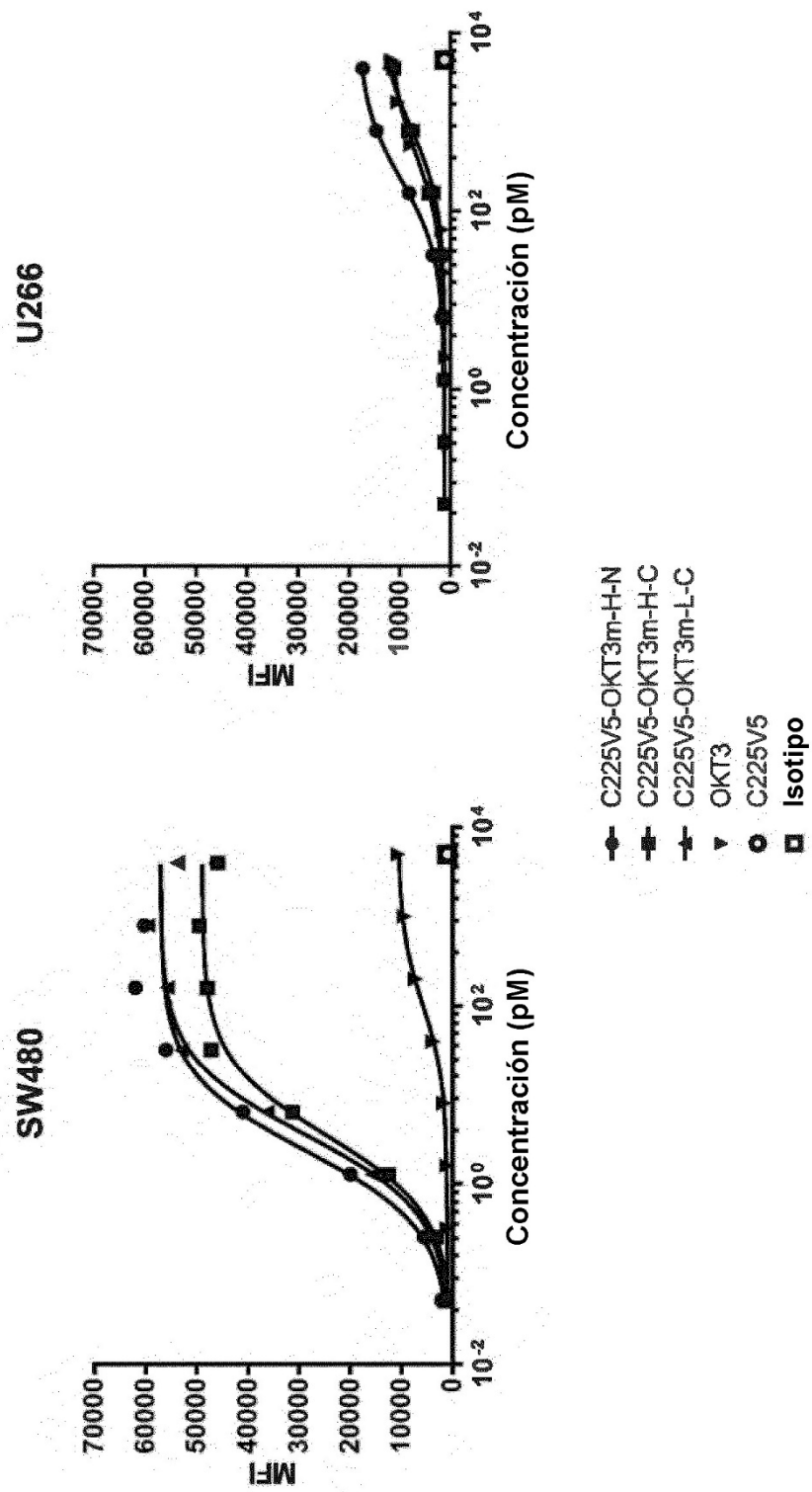


FIGURA 18A

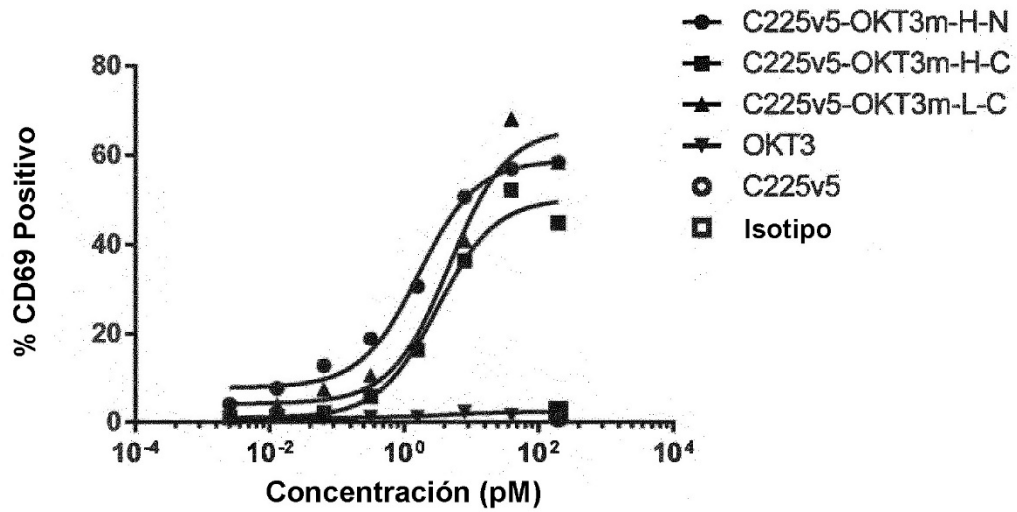


FIGURA 18B

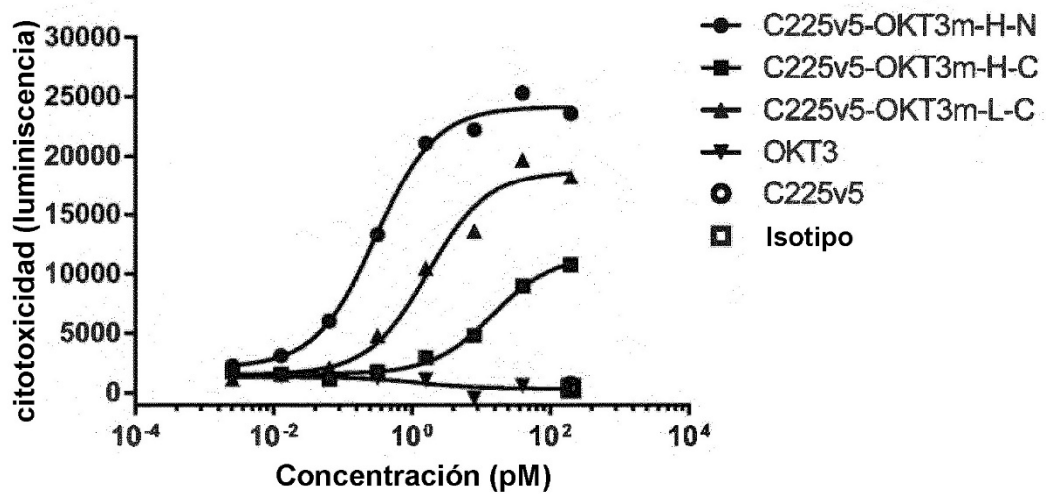


FIGURA 18C

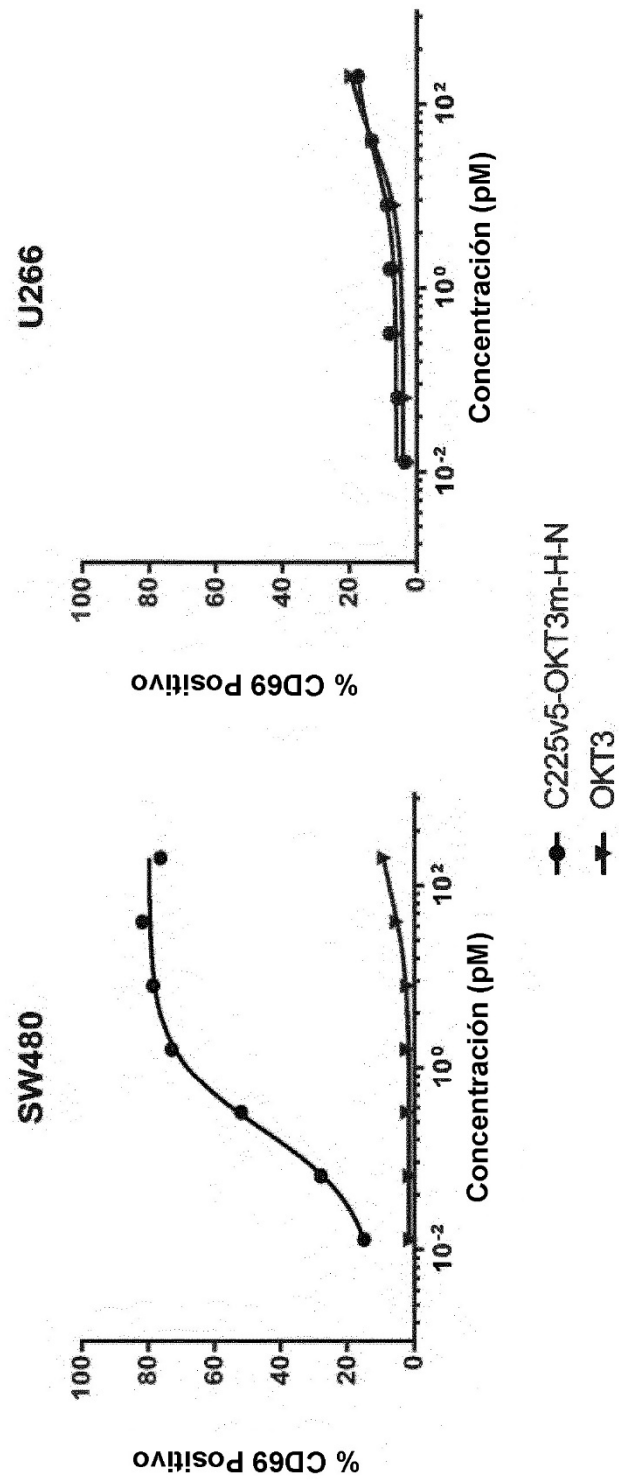
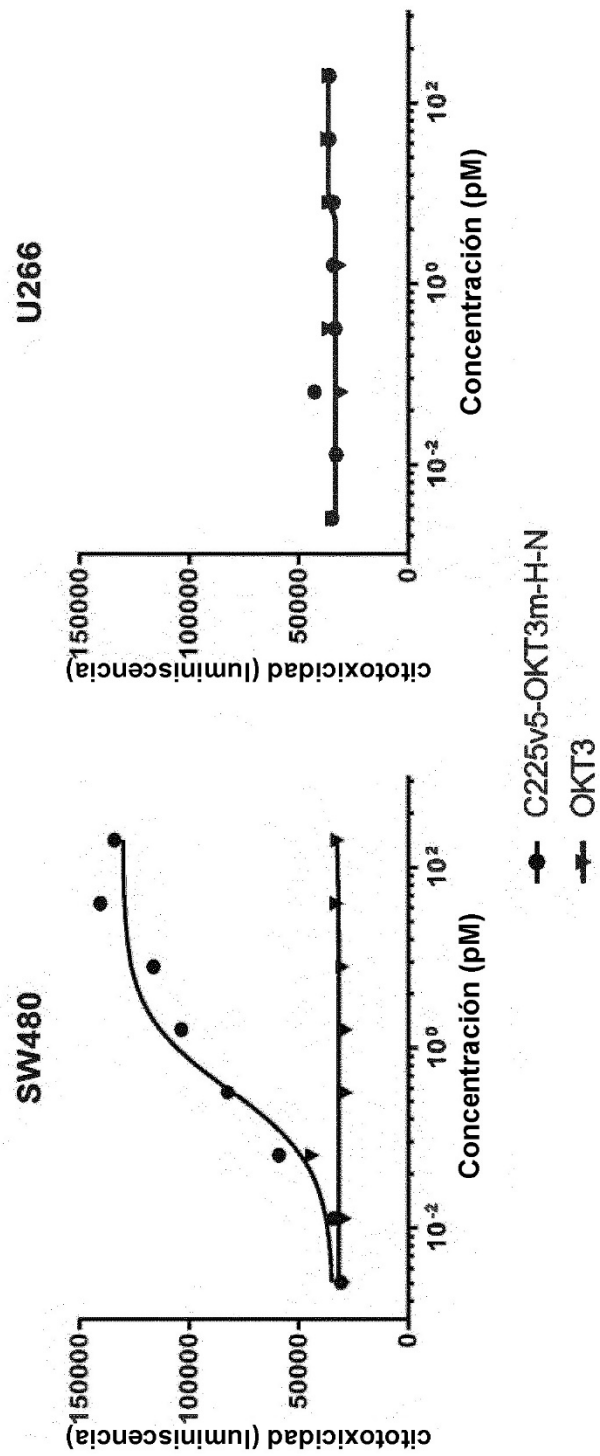


FIGURA 18D



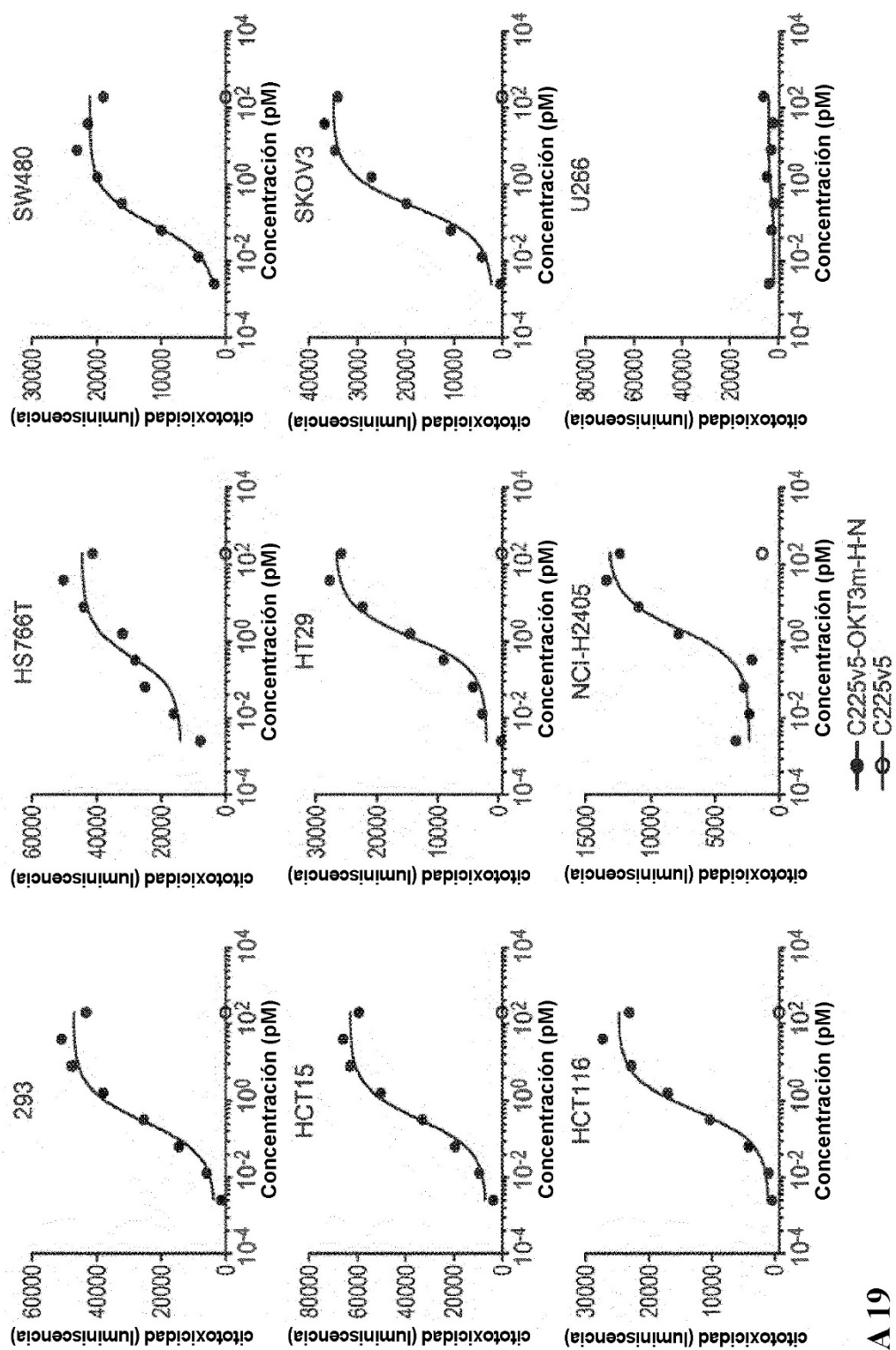


FIGURA 19

FIGURA 20A

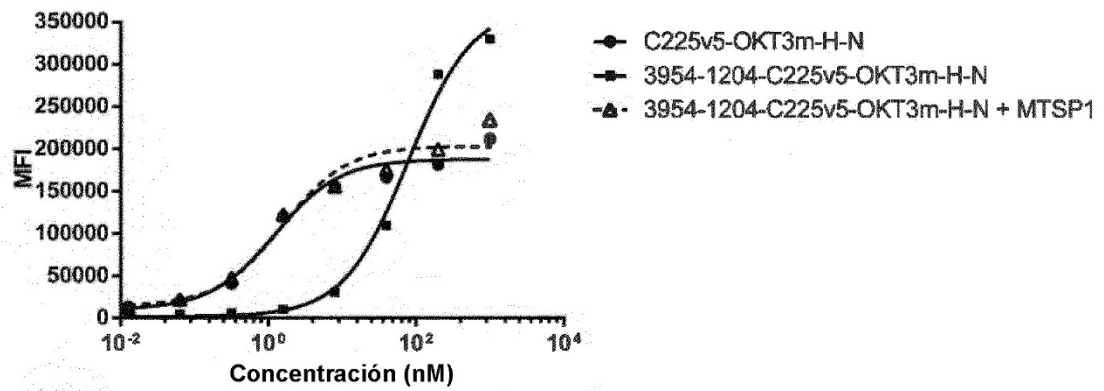


FIGURA 20B

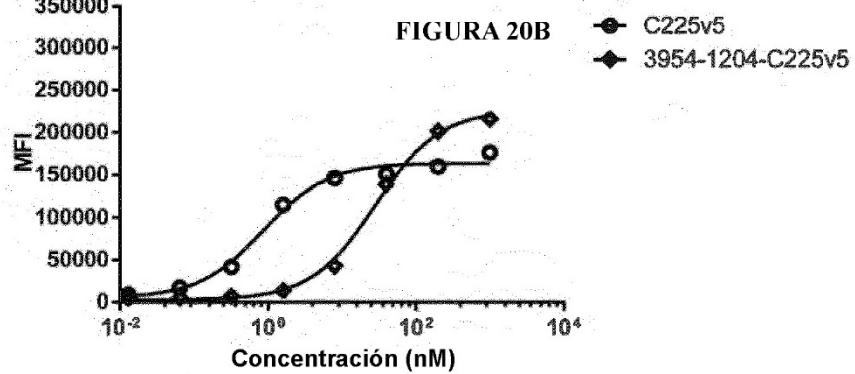


FIGURA 21A

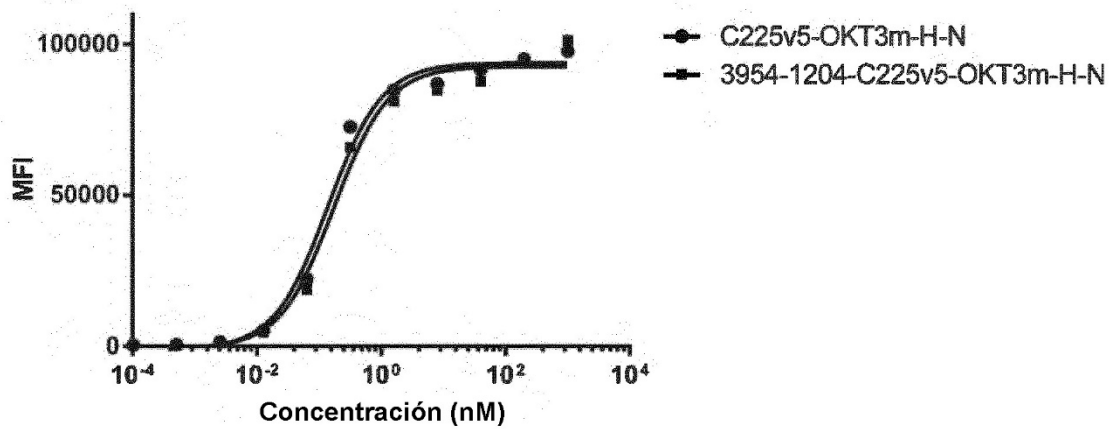


FIGURA 21B

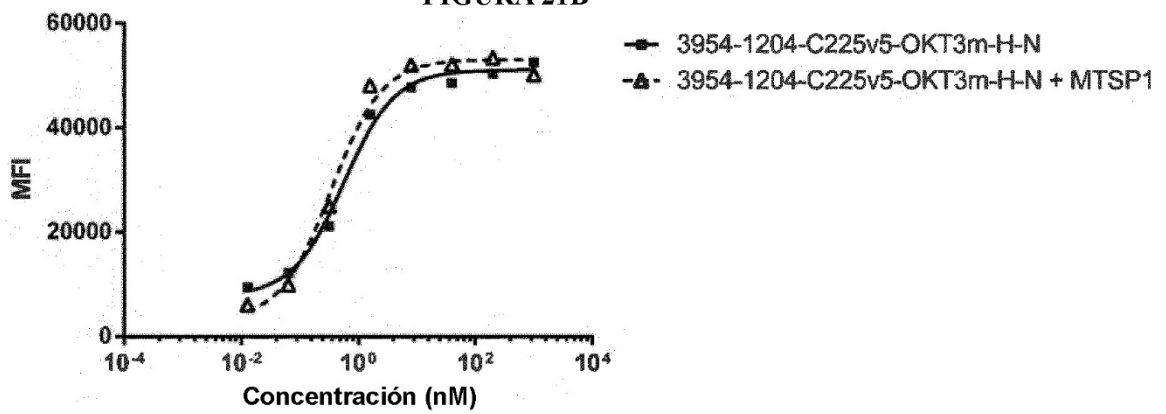


FIGURA 22

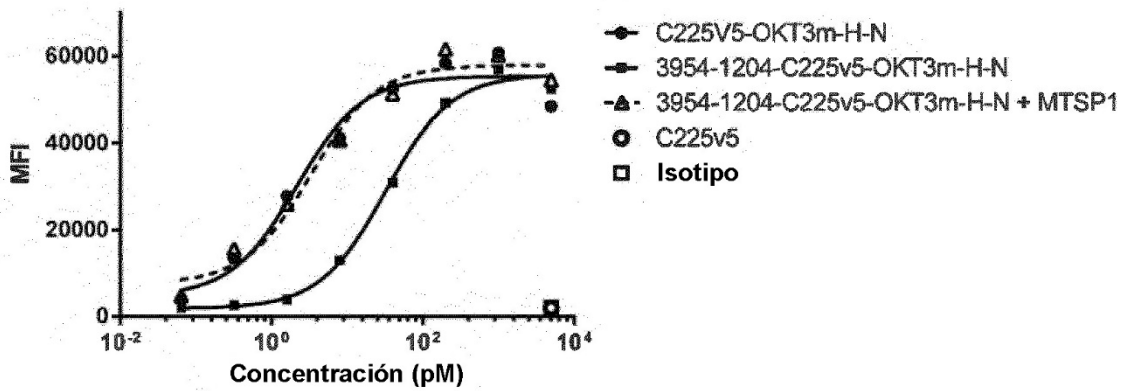


FIGURA 23A

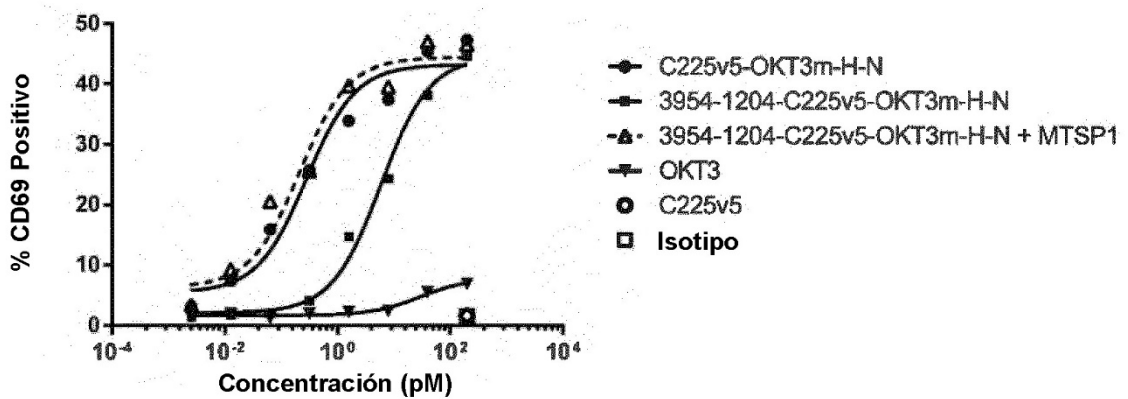


FIGURA 23B

