

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 mono-específicos. 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.

15

20

25

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.

30

RESUMEN DE LA INVENCION

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

35

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.

40

45

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

50

55

60

65

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 un 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 un 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 a 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 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 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 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, 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 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 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 citotóxica 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 scFv, dirigida a un receptor inhibitor expresado en la superficie de un 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 inhibitorios 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 inhibitor/ 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-CD3épsilon (CD3épsilon, también denominado en esta invención CD3épsilon y CD3) scFv y un anticuerpo dirigido o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde al menos uno del scFv anti-CD3épsilon y/o el anticuerpo dirigido o la porción de unión a antígeno del mismo está enmascarado. En algunas realizaciones, el CD3épsilon scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3épsilon, 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 CD3épsilon. 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 CD3épsilon scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3épsilon, 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 CD3épsilon, 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-CD3épsilon scFv y un anticuerpo dirigido a cáncer o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde al menos uno del anti-CD3épsilon scFv y/o el anticuerpo dirigido a cáncer o la porción de unión a antígeno del mismo está enmascarada. En algunas realizaciones, el CD3épsilon scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3épsilon, 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 CD3épsilon. 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 CD3épsilon scFv incluye un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (AB1) que se une a CD3épsilon, 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 CD3épsilon, 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

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 epítopos 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 epítopos 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

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.

60 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.

5 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).

15 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).

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 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 VIWSSGNTDYNTPFSTS (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.

45 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. /

55 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 VIWSSGNTDYNTPFSTS (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.

65 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 VIWSSGNTDYNTPTTS (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
 20 QQNNNWPTT (SEQ ID NO: 17).

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
 25 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 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
 30 VIWSSGNTDYNTPTTS (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).

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
 45 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
 50 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.

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
 60 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
 65 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.

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 pirrolbenzodiazepina.

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, (GG)_n, (GSGG)_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), GGSGG (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

- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 En algunas realizaciones, MM1 tiene una secuencia de polipéptidos que es diferente de la de la diana del AB correspondiente.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 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 10.000 veces mayor que el K_d del AB cuando no está acoplado al MM I hacia su diana o epítipo correspondiente.
- 60 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.
- 65 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 coloca 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 colocalizadas 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 colocaliza 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.

5 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 colocalizada 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 En algunas realizaciones, cada CM en el anticuerpo activable multiespecífico es un polipéptido de hasta 15 aminoácidos de longitud.

40 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 colocaliza 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, legumina 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); RGPA (SEQ ID NO: 37);

45 GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 38); FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 39); VHMLPLGFLGP (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).

50 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, legumina, 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 catepsina, tal como, de modo no taxativo, catepsina 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), legumina y MT-SP1 (matriptasa). En algunas realizaciones, la proteasa comprende uPA. En algunas realizaciones, la proteasa comprende legumina. En algunas realizaciones, la proteasa comprende MT-SP1. En algunas realizaciones, la proteasa comprende una metaloproteínasa de matriz (MMP).

65 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 multiespecifico es un sustrato para al menos dos proteasas seleccionadas de entre el grupo que consiste en uPA, legumaina y MT-SP1.

5 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 multiespecifico
10 comprende más de dos CM. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo activable multiespecifico 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
15 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
20 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 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
30 diana.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecifico se expone y se escinde por una proteasa de modo que, en el estado activado o escindido, el anticuerpo activable multiespecifico 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.
35

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecifico también incluye un péptido señal. En algunas realizaciones, el péptido señal se conjuga con el anticuerpo activable multiespecifico a través de un espaciador. En algunas realizaciones, el espaciador se conjuga con el anticuerpo activable multiespecifico en ausencia de un péptido señal. En algunas realizaciones, el espaciador se une directamente a al menos uno de los MM del anticuerpo activable multiespecifico.
40

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable multiespecifico 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).
45

En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es mayor que la del anticuerpo multiespecifico correspondiente; por ejemplo, la pK del anticuerpo activable multiespecifico es mayor que la del anticuerpo multiespecifico correspondiente. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es similar a la del anticuerpo multiespecifico correspondiente. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es de al menos 15 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es de al menos 12 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es de al menos 11 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es de al menos 10 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es de al menos 9 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es de al menos 8 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es de al menos 7 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es de al menos 6 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es de al menos 5 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es de al menos 4 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en suero del anticuerpo activable multiespecifico es de al menos 3 días cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, la semivida en
50
55
60
65

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 compite 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 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

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

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.

65 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.

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.

25 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 mono-específicos o anticuerpos activables, muestras 9-11.

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.

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

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 los 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 CD3 ϵ -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.

5 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.

15 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.

40 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 mielóide, un macrófago y/u otras células efectoras inmunitarias.

60 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 mielóide, 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 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 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 epítomos diferentes en el mismo antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo de
 30 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
 35 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
 40 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 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
 45 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
 55 de células T en lugar de a 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 al antígeno de un anticuerpo de acoplamiento de
 65 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

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 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 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 formato 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-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-VH*-L3-VL*-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*-L2-CM-L1-MM)₂(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; (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 de scFv está acoplado a un resto de enmascaramiento y al menos uno de los dominios scFv está acoplado a un resto de enmascaramiento. En algunas realizaciones, un anticuerpo activable multiespecífico tiene tanto dominios variables de IgG como dominios scFv, donde cada uno de los dominios variables de IgG y los dominios 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, 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, 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.

- 45 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 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
50 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 seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

- 55 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.

- 60 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
65 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

5 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).

10 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, $\leq 10 \text{ nM}$.

20 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.

40 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.

50 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.

55 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.

60 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.

65 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
10 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
15 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
20 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, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilato, fosforanilato, fosforonmidato, y similares. Véase *p.ej.*,
30 *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 Peynlan* 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
40 convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente descripción. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4 hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, 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
45 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
50 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 *et al.* 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 *et al.* 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 biotilina 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 receptor (ETBR) (FceRI)	IgE Receptor	Mesothelin	TLR2
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 anhydrase 9	CD138	FGF8	IL-12R, IL-12Rbeta1	Notch 1	TNFRS12 A
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	GNPMB	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™ (bevacizumab)	VEGF
Lucentis™ (ranibizumab)	VEGF
Eibitux™ (cetuximab)	EGFR
Vecitibix™ (panitumumab)	EGFR
Remicade™ (infliximab)	TNf α
Humira™ (adalimumab)	TNF α
Tysabri™ (natalizumab)	Integrin α 4
Simulect™ (basiliximab)	IL2R
Soliris™ (eculizumab)	Complement C5
Raptiva™ (efalizumab)	CD11a
Bexxar™ (tositumomab)	CD20
Zevalin™ (ibritumomab tiuxetan)	CD20
Rituxan™ (rituximab)	CD20
Ocrelizumab	CD20
Arzerra™ (ofatumumab)	CD20
Obinutuzumab	CD20
Zenapax™ (daclizumab)	CD25
Adcentris™ (brentuximab vedotin)	CD30
Mylotarg™ (gemtuzumab)	CD33
Mylotarg™ (gemtuzumab ozogamicin)	CD33
Campath™ (alemtuzumab)	CD52
ReoPro™ (abciximab)	Glycoprotein receptor IIb/IIIa
Xolair™ (omalizumab)	IgE
Herceptin™ (trastuzumab)	Her2
Kadcyla™ (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

5 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.

10 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.

5 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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)).

40 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

45 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 epítopo 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 epítopo, 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, 1.000-10.000.000, 10.000-10.000.000, 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 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, 10.000-10.000.000 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

30 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,

35 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*,

45

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).

55

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

65

a la diana y puede enmascarse 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.

5 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).

10 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.

15 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.

20 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
25 (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
30 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.

45 [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)

50 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 es no 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); CISPRGCGSSASQSGQGSHCLIPINMGAPSC (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); CPYYTLYCGCISPRGCPG (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); CPYYTLYCGCISPRGCG (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); QGQSGQQQWCNIWINGGDCRGWNG (SEQ ID NO: 110); PWCQRQDFLRCPQP (SEQ ID NO: 111); QLGLPAYMCTFECLR (SEQ ID NO: 112); CNLWVSGGDCGGLQG (SEQ ID NO: 113); SCSLWTSGSCLPHSP (SEQ ID NO: 114); YCLQLPHYMQAMCGR (SEQ ID NO: 115); -CFLYSCTDVS YWNNT (SEQ ID NO: 116); PWCQRQDYLRCPQP (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); CFLYSCTDVS YW (SEQ ID NO: 135); CTLYSCTDVAYWNSA (SEQ ID NO: 136); CFLYSCTD VSYWGDT (SEQ ID NO: 137); CFLYSCTDVS YWGS (SEQ ID NO: 138); CFLYSCTD VAYWNT (SEQ ID NO: 139); CFLYSCGDVSYWGNPGLS (SEQ ID NO: 140); CFLYSCTDVAYWSGT. (SEQ ID NO: 141); CYLYSCTDGS YWNT (SEQ ID NO: 142);
 15 CFLYSCSDVS Y WGN1 (SEQ ID NO: 143); CFLYSCTDVAYW (SEQ ID NO: 144); CFLYSCTDVS YWGST (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); GAPVFCNIWLNGGDCRGWVG (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); GCNIWLNGGDCRPVVFEG (SEQ ID NO: 163);
 25 GCNIWLSGGDCRMFMNEG (SEQ ID NO: 164); GCNIWVNGGDCRSFVYSG (SEQ ID NO: 165); GCNIWLNGGDCRGWEASG (SEQ ID NO: 166); GCNIWAHGGDCRGFIEPG (SEQ ID NO: 167); GCNIWLNGGDCRTRFVASG (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); QGQSGQGDFDIPFPAHWVPIT (SEQ ID NO: 175); QGQSGQMGPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 176);
 35 YRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 177); PGAFDIPFPAHWVPNT (SEQ ID NO: 178); ESSCVWNYVHTYMDC (SEQ ID NO: 179); YPGCKWNYDRIFLDC (SEQ ID NO: 180); YRTCSWNYVGIFLDC (SEQ ID NO: 181); YGSCSWNY VHIFMDC (SEQ ID NO: 182); YGSCSWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 183); YGSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 184); YTSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 185); YPGCKWNYDRIFLDC (SEQ ID NO: 186); WRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 187); WSNCHWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 188); DRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 189); SGSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 190); SRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 191); SMSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 192); YRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 193); YGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 194); SGSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 195); YKSCHWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 196); YGSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 197); FSSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 198); WRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 199); YGSCQWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 200); YRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 201); NMSCHWNY VHIFLDC (SEQ ID NO: 202); FGPCTWNYARISWDC (SEQ ID NO: 203); XXsCXWXYvhfXdc (SEQ ID NO: 204); MGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 205); RDTGGQCRWDYVHIFMDC (SEQ ID NO: 206); AGVPAGCTWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 207); VGVPNGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 208); DGGPAGCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 209); AVGPAGCVWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 210); CTWNYVHIFMDCGEGEGP (SEQ ID NO: 211); GGVPEGCTWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 212); AEPAGCVWNY VHIFMDC (SEQ ID NO: 213); AGVPAGCTWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 214); SGASGGCKWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 215); MGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 216); TPGCRWNYVHIFMECEAL (SEQ ID NO: 217); VGVPNGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 218); POAFDJPPFAHWVPNT (SEQ ID NO: 219); RGACDIPFPAHWIPNT (SEQ ID NO: 220); QGDFDIPFPAHWVPIT (SEQ ID NO: 221); XGafDIPFPAHWvPnT (SEQ ID NO: 222); RGDGNDSDIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 223); SGVGRDRDIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 224); WAGGNDSDIPFPAHWIPNT (SEQ ID NO: 225); WGDGMDVDIPFPAHWVPVT (SEQ ID NO: 226); AGSGNDSDIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 227); ESRSGYADIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 228); y/o RECGRGDIPFPAHWVPRT (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 $0,001-1500 \times 10^4 M^{-1} S^{-1}$ o a lo 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 $1500 \times 10^{-4} N^{-1} S^{-1}$.

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 Catepsina A Catepsina G
ADAM15 ADAM 17/T ACE	KLK, por ejemplo, KLK4	Quimasa Proteasas del factor de coagulación (por ejemplo, FVI Ia, FIXa, FXa, FXIa,
ADAMDEC1 ADAMTS1 ADAMTS4 ADAMTS5	KLK5 KLK6 KLK7 KLK8	FXIIa) Elastasa Granzima B Guanidinobenzoatasa
	KLK10	HtrA 1
Aspartato proteasas, por ejemplo, BACE Renina	KLK11 KLK13 KLK14	Elastasa de neutrófilos humanos Lactoferrina Marapsina
Catepsinas aspárticas, <i>por ejemplo</i> , Catepsina D Catepsina E	Metaloproteinasas, <i>por ejemplo</i> , Meprina Neprilisina	NS3/4A PACE4 Plasmina PSA
	PSMA	tPA
Caspasas, <i>por ejemplo</i> .. Caspasa 1 Caspasa 2	BMP-1 MMPs por ejemplo,	Trombina Triptasa uPA

ES 2 912 932 T3

Caspasa 3	MMP1	
Caspasa 4	MMP2	Transmembrana tipo II
Caspasa 5	MMP3	Serina proteasas (TTSP), por ejemplo,
Caspasa 6	MMP7	DESC1
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.
- 5 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).
- 10 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.
- 15 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 TD 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); SSRCPAYL (SEQ TD 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 1D NO: 43); SGGPLGVR (SEQ ID NO: 44); y/o PLGL (SEQ ID NO: 45).
- 20 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; MM P19; 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,
- 25 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; MM P19; 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,
- 30 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; MM P19; 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,
- 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; MM P19; 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 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; MM P19; 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,

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); QNQLRMA (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 procariontas. 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-
20 AB o AB-CM- MM.
25

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 unode, 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 ²¹²Bi, ⁶⁴Cu, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹³¹In, ^{99m}Tc, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re y ⁸⁹Zr.

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-difluoro2,4-dinitrobenzeno). 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-metildietilentriaminopentaacético 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

<p>35 40 45 50 55</p>	<p>Auri estatinas Auristatina E Monometil auristatina D (MMAD) Monometil auristatina E (MMAE) Desmetil auristatina E (DMAE) Auristatina F Monometil auristatina F (MMAF) Desmetil auristatina F (DMAF) Derivados de auristatina, <i>por ejemplo</i>, amidas de la misma Auristatina tiramina Auristatina quinolina Dolastatinas Derivados de dolastatina Dolastatina 16 Dm J Dolastatina 16 Dpv Maitansinoides, <i>p.ej.</i> DM-1; DM-4 Derivados maitansinoides Duocarmicina Derivados de duocarmicina Alfa-amanitin</p>	<p>Turbostatina Fenstatinas Hidroxfenstatina Spongi estatina 5 Spongi estatina 7 Hali estatina 1 Hali estatina 2 Hali estatina 3 Briostatinas modificadas Halocomstatinas Pirrolobencimidazoles (PBI) Cibrostatina 6 Doxaliform Aálogos de antraciclinas Análogo de cemadotina (CemCH2-SH) Variante de la toxina A de <i>Pseudomonas</i> (PE38) Variante de la toxina A de <i>Pseudomonas</i> (ZZ-PE38) ZJ-101</p>
---------------------------------------	---	--

	Antraciclinas Doxorrubicina	OSW-1 Derivados de 4-nitrobeniloxicarbonilo de O6-bencilguanina
5	Daunorrubicina Briostatinas Camptotecina Derivados de camptotecina Camptotecina 7-sustituida 10, 11-	Inhibidores de topoisomerasa Hemiasterlina Cefalotaxina Homoharringtonina Dímeros de pirrolobenzodiazepina (PBD) Pirrolobenzodiazepina funcionalizada
10	Difluorometilendioxicamptotecina Combretastatinas Debromoaplisiatoxina Kahalalido F Discodermolida	Caliqueamicina Podofilotoxinas Taxanos Alcaloides de vinca
15	Ecteinascidinas	
	<u>ANTIVIRALES</u>	<u>DETECCIÓN DE CONJUGABLES REACTIVOS</u>
20	Aciclovir Vira A Symmetrel	Fluoresceína y derivados de la misma Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
	<u>ANTIFÚNGICOS</u>	<u>PRODUCTOS RADIOFARMACÉUTICOS</u>
25	Nistatina	¹²⁵ I ¹³¹ I ⁸⁹ Zr ¹¹¹ In ¹²³ I ¹³¹ I ^{99m} Tc ²⁰¹ Tl ¹³³ Xe ¹¹ C ⁶² Cu ¹⁸ F ⁶⁸ Ga ¹³ N ¹⁵ O ³⁸ K ⁸² Rb ^{99m} Tc (Tecnecio)
	<u>ANTINEOPLÁSTICOS ADICIONALES</u>	<u>METALES PESADOS</u>
30	Adriamicina Cerubidina Bleomicina Alkeran Velban Oncovin	Bario Oro Platino
35	Fluorouracilo Metotrexato Tiotepa Bisantreno Novantrona	<u>ANTIMICOPLASMALES</u>
40	Tioguanina Procarbazina Citarabina	Tilosina Espectinomomicina
45	<u>ANTIBACTERIANOS</u>	
50	Aminoglucósidos Estreptomomicina Neomicina Kanamicina Amikacina Gentamicina Tobramicina Estreptomomicina B	
55	Espectinomomicina 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,	

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, maleimidias 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.

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

Tabla 5: Secuencias de enlazadores ejemplares para conjugación

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

	SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 51)	25	
	SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 52)		IEGR (SEQ ID NO: 53)
	<u>Secuencias de factor Xa escindible</u>		IDGR i (SEQ ID NO: 54)
			GGSIDGR (SEQ ID NO: 55)
			PLGLWA (SEQ ID NO: 56)
5	<u>Secuencias escindibles de MMP</u>		GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 57)
	Gelatinasa A		GPQGLLGA (SEQ ID NO: 58)
	<u>Secuencias escindibles de colagenasa</u>		CIAGQ (SEQ ID NO: 59)
	Colágeno de piel de ternera (cadena $\alpha 1$ (I))		GPLGIAGI (SEQ ID NO: 60)
	Colágeno de piel de ternera (cadena $\alpha 2$ (I))		GPEGLRVG (SEQ ID NO: 61)
10	Colágeno de cartílago bovino (cadena $\alpha 1$ (II))		YGAGLGVV (SEQ ID NO: 62)
	Colágeno hepático humano (cadena $\alpha 1$ (III))		AGLGVVER (SEQ ID NO: 63)
	$\alpha 2$ M humano		AGLGISST (SEQ ID NO: 64)
	PZP humano		EPQALAMS (SEQ ID NO: 65)
15	$\alpha 1$ M de Rata		QALAMSAI (SEQ ID NO: 66)
	$\alpha 2$ M de Rata		AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 67)
	$\alpha 4$ 17(2J) de Rata		MDAFLESS (SEQ ID NO: 68)
20	$\alpha 1$ 3(27J) de Rata		ESLPVVAV (SEQ ID NO: 69)
	Colagenasa de fibroblasto humano		SAPAVESE (SEQ ID NO: 70)
	<u>(escisiones autolíticas)</u>		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 lizará 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 catepsina, 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 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 larga, por ejemplo, 50 aminoácidos o más, los términos polipéptido y proteína se usan indistintamente en esta invención.

25 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 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 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, 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 10-20 aminoácidos, o una longitud en el intervalo de 10-15 aminoácidos.

45 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 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 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 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 n° 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

5 une específicamente a una primera diana y/o epítipo, 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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 pirrolbenzodiazepina.

40 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, 10.000-100000, 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, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o mayor o entre 5-10, 10-100, 10-10.000, 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 %
- 10 %, 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*.
- 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 pirrolbenzodiazepina.

30

35

40

- 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.

55

60

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 inmunosorbentes 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. Crowther (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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

30 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.

40 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.

55 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.

5 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.

25 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.

30 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.

40 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).

45 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.

60 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.

65 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 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 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 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 metilparabenos; 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 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 EL™ (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 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 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.

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*, sirilimus (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
 AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAG
 CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCA
 TCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCACCATCAGCAGACT
 GGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCTCACTTTC
 GCGGAGGGACCAAGGTGAAATCAAACGTTCCGGAGGGTTCGACCATAACTTCGTATAATG
 TATACTATACGAAGTTATCCTCGAGCGGTACCCAGGTGCAGCTGGTGCAGACTGGGGGAGG
 CGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCTTATAGC
 AGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTA
 TTAGTGGTASTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTACCATCTC
 CAGAGACAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAGC
 GCCGTATATTACTGTGCGACAAACTCCCTTTACTGGTACTTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCA
 CCCTGGTCACTGTCTCTTCAGCTAGC (SEQ ID NO: 229)

GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGSGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ
 QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPLTF
 GGGTKVEIKRSGGSIITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQTGGGVVQPGRSRLRSCAASGSTFS
 SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (SEQ ID NO: 230)

Anticuerpo CD3 épsilon OKT3 scFv anti-humano;

GGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAG
 GCGGAGGTGAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAAGTGGCACGTCGCGGTGCAAGCGT
 TAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTTGGGTTAAA
 CAGCGTCCGGGTGAGGTTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCA
 ACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCTTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCAGC
 CTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCAGCCTAT
 TATGATGATCACTATTGCCTGGATTATTGGGGTCCAGGGCACCACCCTGACCGTTAGCAGCG
 GTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTCTGACCCA
 GAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGC
 AGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACGTTGGA
 TTTATGATACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGG
 CACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGT
 CAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACCTGGAAATTAATCGT
 (SEQ ID NO: 231)

GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGSGGGVQLQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVK
 QRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARY
 YDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGVQLVQSPAIMSASPGKVTMTCSAS
 SSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKLSGVPAPFRGSGSGTSLTISGMEAEADAATYYC
 QQWSSNPFPTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 232)

Anticuerpo Jagged 4D11v2 Anti-humano: Cadena pesada

gaggtgcacctgttggagctctgggggaggccttggtaacagcctggggggtccctgagactct
cctgtgcagcctctggattcaacctttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctcc
aggaaggggctggagtggtgtcaagtattgacccggaaggtcggcagacatattacgca
gactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgc
aatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagacatcggcgg
caggteggcctttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctctcagctagcacc
aagggcccatcggctcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcgg
ccctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactcagg
cgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccggtgtcctacagtctcagcagctctactcc
ctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttggggcaccagacctacatctgcaacg
tgaatcacaagcccagcaacccaaggtggacaagaaagttagagccaaatcttgtgaaa
aactcacacatgcccaccgtgcccagcaectgaactcctggggggaccgtcagctctctc
tccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctgg
tggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagtccaactggtacgtggacggcgtgga
ggtgcataatgccaagacaaaagccgaggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtggtc
agcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggctc
ccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacatctccaagccaaagggcagccccg
agaaccacaggtgtacacctgccccatcccgaggaggatgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgctgggtcaaaggttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
ggcagccgggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttctt
cctctacagcaagetcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaaagctcttctcatgc
tccgtgatgcatgaggtctctgcacaacctacacgcagaagagcctctccctgtctccgg
gtaaa (SEQ ID NO:233)

EVHLLSEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYYA
DSVKGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:234)

Anticuerpo Jagged 4D11v2 anti-humano: Cadena ligera

Gacatccagatgacccagttctccatccctccctgtctgcatctgttagggagacagagtcacca
tcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaatgggtatcagcagaaaccagg
gaaagcccctaagctcctgatctatgcccacccagtttgcaaagtggggteccatcaagg
ttcagtgccagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaag
atcttgcaacttactactgtcaacagacgggttggtggcgcctccggttattcggccaagggac
caaggtggaaatcaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgat
gagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgaataacttctatcccagag
aggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtg
cacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgancaaa
gcagactacgagaaacacaaagtctacgctgogaagtccccatcagggcctgagctcgc
ccgtcacaagagcttcaacaggggagagtg (SEQ ID NO: 235)

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQTIVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLLK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 236)

Anticuerpo: Jagged 4D11Anti-humano: Cadena pesada

gaggtgcagctgttgagctctgggggagggcttggtacagcctggggggtccctgagactct
cctgtgcagcctctggattcacccttagcagctatgccatgagctgggtccgccaagctcc
agggaaagggctggagtggtgtcaagtattgacccggaaggtcggcagacatattacgca
gactccgtgaagggccgggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgc
aatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagacatcggcgg
caggtcggcctttgactactggggccagggaaacctgggtcaccgtctcctcagctagcacc
aaggcccctcggctctccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcgg
ccctgggtgcctggtaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcagg
cgccctgaccagcggcgtgcacacctccccgctgtcctacagtcctcaggactctactcc
ctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacg
tgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaa
aactcacacatgcccaaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctctcctc

ES 2 912 932 T3

ttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtgg
tggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
ggtgcataatgccaaagacaaagccgcgaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtc
agcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcagggtct
ccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg
agaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
ggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctt
cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
tccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgg
gtaaa (SEQ ID NO: 237)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPFGKGLEWVSSIDPEGRQTYA
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 238)

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

caaggccagtctggccagtgcataatgtgctcgtaggtggtgattgcaggggctggcagg
ggggctcgagcgggtggcagcgggtggctctggtggtctgagcggccggtccgataatcatgg
cggcgggtctgacatccagatgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgtaggagac
agagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcagc
agaaaccagggaaagccccaaagctcctgatctatgcggcatccagtttgcaaagtggggt
cccatcaagggttcagtgccagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctctg
caacctgaagatgttgcaacttactactgtcaacagacgggtgtggcgcctccggtattcg
gccaagggaccaaggtggaatcaaacgtaacgggtgctgcaccatctgtcttcatcttccc
gccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaaataacttc
tatcccagagagggccaaagtagcagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactccc
aggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgac
gctgagcaaagcagactacgagaaacaaaagctctacgcctgcgaagtcacccatcagggc
ctgagctcggccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgt (SEQ ID NO: 239)

QQQSGQCNIWLVGDCRGWQGGSSGGSGGSLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLASVGD
RVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLLXKADYKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 240)

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

GAGGTGCACCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT
CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCC
AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAAGTATTGACCCGGAAGGTCGGCAGACATATTACGCA
GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGC
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGACATCGGCGG
CAGGTCCGCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGG
CGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TCCCCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAAGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTGAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGG
TTAAACAGCGTCCGGGTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTA
TACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGC
ACCGCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCAC
GCTATTATGATGATCACTATTGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCCACCTGACCGTTAG
CAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTG
ACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCG
CCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACG
TTGGATTTATGATACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGT
AGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAAGTGCAGCAACCTATT
ATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACCTGGAAATTAA
TCGT (SEQ ID NO: 241)

EVHLLSEGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYYA
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLVTVSSAST
 KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTRKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGGSGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGA
 SVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSS
 TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQIVL
 TQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAPHRGSG
 SGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 242)

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

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA
 TCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG
 GAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCGGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGG
 TTCAGTGGCAGTGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG
 ATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGACGGTTGTGGCGCCTCCGTTATTCGGCCAAGGGAC
 CAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGANCAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTCAGG
 CTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTCAGGTTAGCTGCAGCAGAGC
 GGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGTTATA
 CCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTAAAACAGCGTCCGGGTGAGGGTCTGGAATGGAT
 TGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCA
 ACCCTGACCACCGATAAAAAGCAGCAGCACCCGCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAG
 AGGATAGCGCAGTTTACTGTGCACGCTATTATGATGATCACTATTGCCTGGATTATTG
 GGGTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCA
 GCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATFATGAGCGCAAGTCCGG
 GTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCA
 GCAGAAAAGCGGCACCAGCCCCGAAACGTTGGATTTATGATACCAGCAAACCTGGCAAGCGGT
 GTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTA
 TGGAAGCAGAAGTGCAGCAACCTATTATTGTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTT
 TGGTAGTGGCACCAAACCTGGAATTAATCGT (SEQ ID NO: 243)

ES 2 912 932 T3

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTLSISLQPEDFATYYCQQTIVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNPFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTSLX
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGQVQLQQS
GAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA
TLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGS
GGGGSQIVLTQSPAISASPEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLSG
VPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID
NO: 244)

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

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCAATATTTGGCTCGTAGGTGGTGATTGCAGGGGCTGGCAGG
GGGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCGATAATCATGG
CGGCGGTCTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTCCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGC
AGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCGGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGT
CCCATCAAGSTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTG
CAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGACGGTTGTGGCGCCTCCGTTATTCG
GCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC
AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCGTGAC
GCTGANCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTG
GCGGTTTCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTGAGGTTTCAGCT
GCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAATGAGCTGTAAAGCA
AGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCCGGGTCAGGGTC
TGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTTGGTTATACCAACTACAACCAGAAATCAA
AGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCGCCTATATGCAGCTGAGCAGC
CTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATCACTATTGCC
TGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
CGGTGGTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGC
GCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGA
ATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCGAAACGTTGGATTATGATACCAGCAAAT
GGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACC
ATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATC
CGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACCTGGAAATTAATCGT (SEQ ID NO: 245)

QGQSGQCNIWLVGGDCRGWQGGSSGGSSGGSLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD
 RVTITCRASQSISSYLWNYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
 QPEDFATYYCQQTIVVAPPELFGQGTQKVEIKRTVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNF
 YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGECGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKA
 SGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSS
 LTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTFLTVSSGGGSGGGGSGGGGSIIVLTQSPRIMS
 ASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAPFRGSGSGTYSYLT
 ISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 246)

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

GAGGTGCACCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCT
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCC
 AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAAGTATTGACCCGGAAGGTCGGCAGACATATTACGCA
 GACTCCGTGAAGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC
 AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGACATCGGCCG
 CAGGTCGGCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACC
 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
 CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGG
 CGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
 TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
 TTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCAGCTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGCTCT
 CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAAGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTGAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGG
 ATCAGGCGGAGGTGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG
 GAAAGAGCCACCCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT
 ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCAC
 TGGCATCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
 AGACTGGAGCCTGAAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTATGGTAGCTCACCGCTCA
 CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTTCCGGAGGGTCGACCATAACTTCGTA
 TAATGTATACTATACGAAGTTATCCTCGAGCGGTACCCAGGTGCAGCTGGTGCAGACTGGG
 GGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCT

ES 2 912 932 T3

TTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
AGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGACAAACTCCCTTTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCG
TGGCACCTGGTCACTGTCTCTTCAGC (SEQ ID NO: 247)

EVHLLSEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYYA
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSSLSPG
ERATLSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS
RLEPEDFAVYYCQQYGSPLTFGGGTKEIKRSGGSTITSYNYVYTKLSSSGTQVQLVQTG
GGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (SEQ ID
NO: 248)

Anticuerpo multiespecifico .Anti-Jagged 4D11v2-anti-CTLA-4: Cadena ligera

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA
TCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATGGTATCAGCAGAAACCAGG
GAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCGGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGG
TTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG
ATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGACGGTTGTGGCGCCTCCGTTATTCGGCCAAGGGAC
CAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
GAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
AGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGANCAAA
GCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAATCAGGGCCTGAGCTCGC
CCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGG
CTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTGAAATTTGTGTTGACACAGTCT

CCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA
GTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT
CATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCT
GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACT
GTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACG
TTCCGGAGGGTCGACCATAACTTCGTATAATGTATACTATACGAAGTTATCCTCGAGCGGT
ACCCAGGTGCAGCTGGTGCAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGAC
TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGACAAACTCCCT
TTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCTTCAGCTAGC

(SEQ ID NO: 249)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTLSISLQPEDFATYYCQQTIVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTKK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS
PGTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS
GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPLTFGGGTKEIKRSGSTITSYNVYYTKLSSG
TQVQLVQTGGGVVQGRSLRLSCAASGTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS

(SEQ ID NO: 250)

Anticuerpo Activable Multiespecifico Anti-Jagged-anti-CTLA-4 5342-1204~4D11v2—CTLA-4: Cadena ligera c

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCAAATATTTGGCTCGTAGGTGGTGATTGCAGGGGCTGGCAGG
GGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCGATAATCATGG
CGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGC
AGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCGGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGT
CCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTG
CAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGACGGTTGTGGCGCCTCCGTTATTCG
GCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC

GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC
 AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAC
 GCTGANCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
 CTGAGCTCGCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTG
 GCGGTTGAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTGAAATTGTGTT
 GACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
 GCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTC
 CCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAAGTGG
 CAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA
 GTGTATTACTGTGAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCCGGCGAGGGACCAAGGTGG
 AAATCAAACGTTCCGGGAGGGTCGACCATAACTTCGTATAATGTATACTATAACAAGTTATC
 CTCGAGCGGTACCCAGGTGCAGCTGGTGCAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGG
 TCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGG
 TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAG
 CACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC
 ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGA
 CAAACTCCCTTTACTGGTACTTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCTTC
 AGCTAGC (SEQ ID NO: 251)

QQSGQCNILVGGDCRQWQGGSSGGSSGGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGD
 RVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
 QPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
 YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLLXKADYEEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGECGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
 ASQSVSSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA
 VYYCQQYGSPLTFGGGKTKVEIKRSGGSTITSYNVYTKLSSSGTQVQLVQTGGGQVQPR
 SLRLSCAASGSTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKSN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (SEQ ID NO: 252)

Anti-EGFR :c225v5 : Cadena Pesada de Anticuerpos

caggtgcagctgaaacagagcggccccggcctggtgcagccgagccagagcctgagcatta
 cctgcaccgtgagcggccttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcgccagagccc
 gggcaaaggcctggaatggctggcggtgatattggagcggcggcaacaccgattataacacc

ccgtttaccagccgcctgagcattaacaaaagataacagcaaaagccaggtgttttttaaaa
 tgaacagcctgcaaagccaggataaccgcgatttattattgcgcgcgcgcgctgacctatta
 tgattatgaatttgcgtattggggccagggcaccctggtagcctgagcgcggctagcacc
 aagggcccacatcgggtcttccccctggcaccctcctccaagagcaccctctgggggcacagcgg
 ccttgggtgcctggtaaggactacttccccgaaccggtagcgggtgctggtggaactcagg
 cgcctgaccagcggcgtgcacacettccccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc
 ctgagcagcgtggtgaccgtgcctcaccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacg
 tgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaagttagcccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccaccgtgcccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagtcctctctc
 tccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctccccggaccctgaggtcacatgctgtgg
 tgggtgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtccaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtc
 agcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaggctct
 ccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg
 agaaccaacaggtgtacaccctgcccccatccgggatgaactgaccaagaaccaggtcagc
 ctgacctgctggtcaaaggttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
 ggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctccttctt
 cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
 tccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaecgcagaagagcctctccctgtctccgg
 gtaaatga (SEQ ID NO: 253)

QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNT
 PFTSRLS INKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAAST
 KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 254)

Anticuerpo anti-EGFR C225v5: Cadena Ligera

CAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCT
 TTAGCTGCCGCGGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAA
 CGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGC

TTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAAGCGAAG
 ATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCAC
 CAAACTGGAAGTGAACCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 255)

QILLTQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSR
 FSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQONNWPFTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNFPYPREARVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 256)

Anticuerpo Anti-EGFR C225v5: Cadena pesada

caggtgcagctgaaacagagcggcccggcctggtgcagccgagccagagcctgagcatta
 cctgcaccgtgagcggctttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcgcccagagccc
 gggcaaaggcctggaatggctggcgtgatctggagcggcggcaacaccgattataacacc
 ccgtttaccagccgctgagcattaacaaaagataacagcaaaagccaggtgttttttaaaa
 tgaacagcctgcaaagcaacgataaccgcgatttattattgcgcgcgcgctgacctatta
 tgattatgaatttgcgtattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcgcggctagcacc
 aagggcccacggtcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcgg
 cctgggtgctgctggtcaaggactacttcccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcagg
 cgccctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc
 ctgagcagcgtggtgaccgtgcccctcagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacg
 tgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagcgcgttgagcccaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaaactcctggggggaccgtcagctcttctc
 ttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgctgg
 tgggtggacgtgagccaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtc
 agcgtcctcaccgtcctgaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtct
 ccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg
 agaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgaaactgaccaagaaccaggtcagc
 ctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
 ggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggtctcttctt
 cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
 tccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacaagcagaagagcctctcccctgtctccgg
 gtaaa (SEQ ID NO: 257)

ES 2 912 932 T3

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 258)

Anticuerpo Anti-EGFR C225v5: Cadena ligera

Ggcggtacccagatcttgctgaccagagcccggtgattctgagcgtgagcccgggcgaacgtgtgagctttagctgccgcgagccagagcattggcaccacattcattggtatcagcagcgaccaaagcagcccgcgctgctgattaaatgcgagcgaagcattagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacagcgtggaagcgaagatattgctgattattattgccagcagaacaacaactggccgaccacctttggcgcgggcaccaaaactggaactgaaacgtacggtggtgacccatctgtcttcattctccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtygataacgcctccaatcgggtaactcccaaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggaacagcacctacagcctcagcagcaccctgagcctgagcaaaagcagactacgagaaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaaagagcttcaacaggggagcg (SEQ ID NO: 259)

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 260)

Anticuerpo Anti-EGFR C225v4: Cadena pesada

caggtgcagctgaaacagagcggcccgccctggtgcagccgagccagagcctgagcatta
 cctgcaccgtgagcggctttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcgcccagagccc
 gggcaaaaggcctggaatggctggcgatgttgagcggcggaacaccgattataacacc
 ccgtttaccagccgctgagcattaaacaaagataaacagcaaaagccaggtgttttttaaaa
 tgaacagcctgcaaagcaacgataccgcgatttattattgcgcgcgcgctgacctatta
 tgattatgaatttgcgtattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcgcggetagcacc
 aagggcccatcggctcttccccctggcaccctcctccaagagcaacctctgggggcacagcgg
 cctgggtgcctggctcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctgfggaactcagg
 cgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc
 ctgagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacg
 tgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagagcccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccaccgtgcccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagctcttctc
 tccccccaaaaccocaaaggacaccctcatgatctcccggaaccctgaggtcacatgcgtgg
 tgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtccaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaaagacaaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtc
 agcgtcctcacgctcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctct
 ccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaaccatctccaaaagccaaagggcagccccg
 agaaccaacaggtgtacaccctgccccatcccggtatgaactgaccaagaaccaggtcagc
 ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcagacatcgccgtggagtgaggagcaatg
 ggagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggctccttctt
 cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
 tccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgg
 gtaaatga (SEQ ID NO: 261)

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYN
 PFTSRLSINKDNSKQVFFKMNLSQNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAAST
 KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 LSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 262)

Anticuerpo Anti-EGFR C225v4: Cadena Ligera

Cagatcttgetgacccagagcccggtgattctgagcgtgagccggcggaacgtgtgagct
 ttagctgccgcgcgagccagagcattggcaaccaacattcattgggtatcagcagcgcaccaa
 cggcagcccgccctgctgattaaatagcgagcgaagcattagcggcattccgagccgc
 tttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaag
 atattgocgattattattgcccagcagaacaacaactggccgaccacctttggcgcgggca
 caaactggaactgaaacgtacgggtggtgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgat
 gagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgectgctgaataacttctatcccagag
 aggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactccaggagagtg
 cacagagcaggacagcaaggacagcacctaagcctcagcagcacctgacgctgagcaaa
 gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgc
 ccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgtag (SEQ ID NO: 263)

QILLTQSPVILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKYASESISGIPSR
 FSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYICQONNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 264)

Anticuerpo Anti-EGFR C225v6: Cadena pesada

caggtgcagctgaaacagagcggcccgccggtgagccgagccagagcctgagcatta
 cctgcaccgtgagcggcttagcctgaccaactatggcgtgcatgggtgcccagagccc
 gggcaaaggcctggaatggctggcgctgatttgagcggcggcaacaccgattataacacc
 ccgtttaccagccgctgagcattaacaaaagataaacagcaaaaagccaggtgttttttaaaa
 tgaacagcctgcaaagccaggataaccgcgatttattattgcgcgcgcgctgacctatta
 tgattatgaatttgctattggggccagggcacccctggtgaccgtgagcgcggctagcacc
 aagggcccatcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggcacagcgg
 cctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcagg
 cgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc
 ctgagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaaccagacctacatctgcaacg
 tgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctctcctc
 tccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctgg
 tgggtggacgtgagccaagagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaaagacaaaagccgcgggagggagcagtacgccagcacgtaccgtgtggtc

agcgtcctcacogtccctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtct
ccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg
agaaccaaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgaaactgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
ggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgaecggtccttctt
cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
tccgtgatgcatgaggetctgcacaaccactacaacgcagaagagcctctccctgtctccgg
gtaaata (SEQ ID NO: 265)

QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNT
PFTSRLS INKDNSKSQVFFKMNLSQSDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAAST
KGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 266)

Anticuerpo .Anti-EGFR C225v6: Cadena ligera

Cagatcttgcctgacccagagcccggtgattctgagcgtgagccccggcgaaecgtgtgagct
ttagctgccgcgcgagccagagcattggca ccaacattcattggtatcagcagcgcaccaa
cggcagccccgcctgctgattaaatgctgagcgaagcattagcggcattccgagccgc
tttagcggcagcggcagcggcaccgatcttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaag
atattgcgattattattgcccagcagaacaacaactggccgaccaccttggcgcgggcac
caactggaactgaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgat
gagcagttgaaatctggaactgcctctgttctgtgctgctgaataacttctatcccagag
aggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtg
cacagagcaggacagcaaggacagcaccta cagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaa
gcagactacgagaaacacaaagtctacgectgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgc
ccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgtag (SEQ ID NO: 267)

5 QILLTQSPVILSVSPGERVFS CRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSR
FSGSGSGTDFTL SINSVESEDIADYYCQNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPS VFI FPPSD
EQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTL SK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (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] [tgcatctcaacctcggtggttgcggaacggccatacgtca
tgtagcggctcgagcgggtggcagcgggtggctctggtggatccggg] [ctgagcggccgttcc
gataatcat] [ggcagtagcgggtacc] [cagatcttgctgaaccagagcccgggtgattctg
agcgtgagcccggcggaacgtgtgagcttttagctgcccggcgagccagagcattggcacca
acattcatttggtatcagcagcgcaccaacggcagcccggcctgctgattaatatgcgag
cgaaagcatttagcggcattccgagccgcttttagcggcagcggcagcggcaccgattttacc
ctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgoggattattattgccagcagaacaaca
actggccgaccacctttggcggcggcaccacaactggaactgaaacgtacgggtggctgcacc
atctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtg
tgctctgaataacttetatcccagagagggccaaagtacagtggaaaggtggataacgccc
tccaatcgggtaactcccaggagagtgctcagagcaggacagcaaggacagcacctacag
cctcagcagcaccctgacgtgagcaaacgagactacgagaaacacaaagtctacgcctgc
gaagtcacccacagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtggt
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)] [Xiafcer .2 (SEQ ID NO: 289)] [C225v5 (SEQ ID NO: 256)]

5

[QGQSGQ] [CISPRGCPDGPYVMY] [GSSGGSGGGSGG] [LSGRSDNH] [GSSGT] [QIL
LTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLINSVESEDIADYCYQNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*] (SEQ ID NO: 270)

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

CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATT
CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCC
GGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGCGGCAACACCGATTATAACACC
CCGTTTACCAGCCGCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAA
TGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCTGACCTATTA
TGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
CCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGG
CGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGGCTGTCTTACAGTCTTCAGGACTCTACTCC

10

CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
 TGAATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
 TTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT
 CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAACTGACCAAGAACCAGGTGAGC
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAAGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTGAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGG
 ATCAGCGCGGAGGTGAGGTTGAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAAGTGGCACGTCCGGGTGCA
 AGCGTTAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTTACCCGTTATACCATTGCATTGGG
 TTAAACAGCGTCCGGGTGAGGCTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTA
 TACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCCTGACCACCGATAAAAAGCAGCAGC
 ACCGCCATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCAC
 GCTATFATGATGATCACTATTGCTGGATTATTGGGGTTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAG
 CAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTG
 ACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCG
 CCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACG
 TTGGATTTATGATACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGT
 AGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATT
 ATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACCTGGAAATTA
 TCGT (SEQ ID NO: 271)

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKLEWLGVWSSGNTDYNT
 PFTSRLSINKDNSKQVFFKMNLSQSDTAIYYCARALTYDYEFAYWQGTLVTVSAAST
 KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
 LITCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGVQLQOQSGAELARPGA
 SVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSS
 TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSGQIVL
 TQSPAIMSASFGKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAAHFRGSG
 SGTSYSLTISGMEAEADAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 272)

CAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCT
 TTAGCTGCCGCGGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAA
 CGGCAGCCCGCGCTGCTGATTAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGC
 TTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAAGCGAAG
 ATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCAC
 CAAACTGGAACGTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGG
 CTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCCGAGGTCAGGTTACAGCTGCAGCAGAGC
 GGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATA
 CCTTTACCCGTTTATACCATGCATTGGGTTAAAACAGCGTCCGGGTGAGGGTCTGGAATGGAT
 TGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCA
 ACCCTGACCACCGATAAAAAGCAGCAGCACCGCCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAG
 AGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATCACTATTGCCTGGATTATTG
 GGGTCAGGGCACCACCCTGACCCTTAGCAGCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 GCGGTTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGG
 GTGAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCA
 GCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACGTTGGATTATGATAACCAGCAAACCTGGCAAGCGGT
 GTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTA
 TGGAAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTT
 TGGTAGTGGCACCAAACCTGGAATTAATCGT (SEQ ID NO: 273)

QILLTQSPVILSVSPGERVVSFCRASQSIGTNIHWYQQRITNGSPRLLIKYASESISGIPSR
 FSGSGSDTDFLSINSVESEDIADYYCQNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGQVQLQQS
 GAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA
 TLTTDKSSSTAYMQLSLSLTSSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGS
 GGGGSIIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKLSAG
 VPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR. (SEQ ID
 NO: 274)

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

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCATCTCACCTCGTGGTTGTCCGGACGGCCCATACGTGATGT
 ACGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGATCCGGTCTGAGCGGCCGTTCCGATAA
 TCATGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGC
 CCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTTCATT
 GGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCAT
 TAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATT
 AACAGCGTGGAAAGCGAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAAACAACACTGGCCGA
 CCACCTTTGGCGCGGGCACCAAACTGGAAGTGAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT
 CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG
 AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
 GTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG
 CACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC
 CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGAT
 CTGGAGGTGGCGGTTTCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTCA
 GGTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCGGGTGCAAGCGTTAAATGAGC
 GTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTAAACAGCGTCCGG
 GTCAGGGTCTGGAAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAACCA
 GAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAAGCAGCAGCACCGCCTATATGCAG
 CTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATC
 ACTATTGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCAACCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTGG
 TAGTGGTGGCGGTGGTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCA
 ATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTA
 GCTATATGAATTTGGPATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACGTTGGATTATGATAC
 CAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTTCGTGGTACCGGTAGCGGCACCTCATAT
 AGCCTGACCATTAGCGSTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGT
 CAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAACTGGAAATTAATCGT (SEQ ID
 NO: 275)

QQQSGQCISPRGCPDPYPVVMYGSSGGSGSGSGL5GRSDNHGSSGTQILLTQSPVILSVS
 PGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLISI
 NSVESEDIADYYCQQNNWPTTFGAGTKLELKRIVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGSGGGSGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMS
 CKASGYTFTRYTMHWVKQRPGGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQ
 LSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSIIVLTQSPA
 IMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRNIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTYSY
 SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 276)

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

CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATT
 CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGATGGGTGCGCCAGAGCCC
 GGGCAAAGGCCGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACCCGATTATAACACC
 CCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAA
 TGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATTA
 TGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACC
 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
 CCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGG
 CGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
 TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTC
 TTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT
 CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAACTGACCAAGAACCAGGTACAG
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 GGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAAGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGG
 ATCAGGGCGGAGGTGAAATTTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG
 GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT
 ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCAC
 TGGCATCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
 AGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCA
 CTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTTCCGGAGGGTCCGACCATAACTTCGTA
 TAATGTATACTATAACGAAGTTATCCTCGAGCGGTACCCAGGTGCAGCTGGTGCAGACTGGG
 GGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCT
 TTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
 AGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTTACC
 ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
 ACACGGCCGTATATTAAGTGTGCGACAAACTCCCTTTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCG
 TGGCACCCCTGGTCACTGTCTCTTCAGCTAGC (SEQ ID NO: 277)

QVQLKQSGPGLVQPSSLISITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNT
 PFTSRLSINKDNSKSNQVFFKMNLSLQSDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAAST

ES 2 912 932 T3

TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGACAACTCCCT
TTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCTTCAGCTAGC
(SEQ ID NO: 279)

QILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKYASESISGIPSR
FSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
PGTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS
GTDFTLTIISRLPEDEFAVYYCQQYGSPLTFGGGTKVEIKRSGGSTITSYNVIYTKLSSSG
TQVQLVQTTGGGVVQPRSLRSLSCAASGTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS
(SEQ ID NO: 280)

Anticuerpo activable multiespecifico anti-EGFR - Anti-CTLA-4 3954-1204 -C225v5-CTLA-4: Cadena ligera

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCATCTCACCTCGTGGTTGTCCGGACGGCCCATACGTTCATGT
ACGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGATCCGGTCTGAGCGGCCGTTCCGATAA
TCATGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGC
CCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCGCAGGCCAGAGCATTGGCACCAACATTTCATT
GGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCAT
TAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATT
AACAGCGTGGAAAGCGAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACTGGCCGA
CCACCTTTGGCGCGGGCACCAAACTGGAACGTAACCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT
CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACGCTCTGTTGTGTGCTGCTG
AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
GTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG
CACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC
CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGAT
CTGGAGGTGGCGGTTTCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTGA
AATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTC
TCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTG

GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAG
 GTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGA
 CCAAGGTGGAATCAAACGTTCCGGAGGGTTCGACCATAACTTCGTATAATGTATACTATAC
 GAAGTTATCCTCGAGCGGTACCCAGGTGCAGCTGGTGCAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAG
 CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCTTTAGCAGCTATGCCA
 TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAG
 TGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAT
 TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATT
 ACTGTGCGACAAACTCCCTTTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCAC
 TGTCTCTTCAGCTAGC (SEQ ID NO: 281)

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYSSGGSSGGSSGSLSGRSDNHGSSGTQILLTQSPVILSVS
 PGERVFSFCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLISI
 NSVESEDIADYYCQQNNNWPFTTFGAGTKLELKRVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGSSGGSSGGSSGGGGEIVLTQSPGTLTSLSPGERATL
 SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE
 DFAVYYCQQYGSPLTFGGGKVEIKRSGGSTITSYNYVYTKLSSSGTQVQLVQTGGGVVQ
 PGRSLRLSCAASGSTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (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 HCRevOL (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
 20 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
HCFForNhe	CTCAGCTAGCACCCAGGGCCCATCGGTC	SEQ ID NO: 3
HCRRevOL	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, HCFForNhe 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 multiespecíficos correctos o anticuerpos activables multiespecíficos, 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 multiespecíficos y anticuerpos activables multiespecíficos

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 multiespecíficos.

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

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

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

15 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 específico, Sigma, St Louis, MO; Cat v A0293-1ML) y se desarrolló con el sustrato cromogénico TMB.

20 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.

30 **EJEMPLO 3: Unión de OKT3 a CD3ε**

35 Como se muestra en la Fig. 13, los experimentos de unión a ELISA revelaron que el anticuerpo activable multiespecífico anti-EGFR 3954-1204-C225v5-OKT3 y el anticuerpo activable multiespecífico 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 multiespecífico anti-EGFR purificado 3954-1204-C22Sv5-CTLA-4, anticuerpo activable multiespecífico anti-EGFR 3954-1204-C225v5-OKT3, anticuerpo activable multiespecífico anti-Jagged 5342-1204-4D11v2-CTLA-4, o anticuerpo activable multiespecífico 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.

40 **EJEMPLO 4: Activación de profesa de anticuerpos activables multiespecíficos.**

Activación

45 Los anticuerpos multiespecíficos y los anticuerpos activables multiespecíficos 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

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTRYTMHWVKQRPGGLEWIGYINPSRGYTNYN
 QKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGG
 GSGGGGSGGGGSQIVLTQSPA IMSASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYD
 TSKLASGVP AHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEADAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR

45 (SEQ ID NO: 306)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGGTT CAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAATGA
GCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCC
GGGTCAGGGTCTGGAAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAAGCAGCAGCACCCGCTATATGC
AGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGA
TCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGT
GGTAGTGGTGGCGGTGGTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGG
CAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGT
TAGCTATATGAATTTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCCGAAACGTTGGATTTATGAT
ACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCAT
ATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTG
GTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACCTGAAATTAATCGT (SEQ ID
NO: 307)

Anticuerpo OKT3m scFv Lv
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

5

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKSLASGVPAHF
RGS SGT SYSLTISGMEAEDAATYYCQWSNPF TFGSGTKLEINR (SEQ ID NO:
308)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCA
TGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCAC
CAGCCCCGAAACGTTGGATTTATGATACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTT
CGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATG
CAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAA
ACTGAAATTAATCGT (SEQ ID NO: 309)

10

Anticuerpo OKT3m scFv Hv
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

15

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYN
QKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSS
(SEQ ID NO: 310)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGA
GCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCC
GGGTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAAGCAGCAGCACCAGCTATATGC
AGCTGAGCAGCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGA
TCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAGCAGC (SEQ ID
NO: 311)

5 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 multiespecifico o un anticuerpo
activable, respectivamente
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

GGSSGGSSGSSGGSSGGSSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVK
QRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARY
YDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGSSGGSSGGSSGGSSQIVLTQSPA IMSASPGKVTMTCSAS
SSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYC
QQWSSNPFTFGSGTKLEINR* (SEQ ID NO: 290)

10 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

GGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAG
GCGGAGGTTCAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGT
TAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAA
CAGCGTCCGGGTTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCA
ACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCAAACCCTGACCACCGATAAAAAGCAGCAGCACCAGC
CTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTAT
TATGATGATCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAGCAGCG
GTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTTGGTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCA
GAGTCCGGCAATPATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGC
AGCAGCGTTAGCTPATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCCGAAACGTTGGA
TTTATGATAACCAGCAAACCTGGCAAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGG
CACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGT
CAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACCTGGAAATTAATCGTT
GA (SEQ ID NO: 291)

15 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 multiespecifico o anticuerpo activable respectivamente
SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYN
QKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGG
GSGGGSSGGSSQIVLTQSPA IMSASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYD
TSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGG
GS (SEQ ID NO: 292)

20 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCTGGGTGCAAGCGTTAAAATGA
 GCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCC
 GGGTCAGGGTCTGGGAATGGATTTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAAC
 CAGAAATCAAAGATAAAGCAACCC'TGACCACCGATAAAAAGCAGCAGCACCGCCTATATGC
 AGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGA
 TCACTATAGCCTGGATTTATTGGGGTCAGGGCACCACCC'TGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGT
 GGTAGTGGTGGCGGTGGTTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGG
 CAATTTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGT
 TAGCTATATGAATTTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCCGAAACGTTGGATTTATGAT
 ACCAGCAAAC'TGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCAT
 ATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTGAGCAGTG
 GTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAAC'TGAAAATTAATCGTGGAGGTGGT
 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
 QKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGG
 GSGGGGSGGGGSGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYD
 TSKLASGVPAAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGG
 GSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDY
 NTPFTSRLSINKDNSKSKQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTTLTVSAA
 STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLRHQLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
 VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 294)

10 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

ES 2 912 932 T3

CAGGTT' CAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCAAGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGA
GCTGTAAAGCAAGCGGTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGT'FAAACAGCGTCC
GGGTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAAGATAAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAAGCAGCAGCACCAGCTATATGC
AGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTAT' TACTGTGCACGCTATTATGATGA
TCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGT
GGTAGTGGTGCCGGTGGTT' CAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGG
CAAT' TATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGT
TAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCCGAAACGTTGGATT' TATGAT
ACCAGCAA' ACTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCAT
ATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTG
GTCAAGCAATCCGTT' TACCTTTGGTAGTGGCACCAA' ACTGAAAATTAATCGTGGAGGTGGT
GGATCCCAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGA
GCATTACCTGCACCGT' GAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCA
GAGCCC' GGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTAT
AACACCCCGTT' TACCAGCCGCCTGAGCATTAA' CAAAAGATAACAGCAAAGCCAGGTGTTTT
TTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATA' CCGGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGAC
CTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCT
AGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA
CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT' TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAA
CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGT' GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TGACAAA' ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTC
TTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCT
GTGGT' CAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACA' ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC
CTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC' ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 295)

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

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNT
 PFTSRLSINKDNSKSKQVFFKMNLSQSDTAIYYCARALTYDYEFAYWQGTLLVTVSAAST
 KGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFL
 FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGA
 SVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSS
 TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSIIVL
 TQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSG
 SGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR* (SEQ ID NO: 296)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATT
 CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCC
 GGGCAAAGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGCGGCAACACCGATTATAACACC
 CCGTTFACCAGCGCCTGAGCATTAAACAAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTAAAA
 TGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATTA
 TGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACC
 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
 CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGG
 CGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
 TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTC
 TTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCGTCTTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT

CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 GGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAAGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGGCTCTGGCCGGAGGCTCAGSTGGTGGAGG
 ATCAGGCGGAGGTCAGGTTTCAGCTGCAGCAGCGGTGCAGAACCTGGCACGTCCGGGTGCA
 AGCGTTAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGG
 TTAAACAGCGTCCGGGTTCAGGTTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTA
 TACCAACTACAACCAGAAATCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAAGCAGCAGC
 ACCGCCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCAC
 GCTATTATGATGATCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAG
 CAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTG
 ACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCG
 CCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAAACG
 TTGGATTTATGATACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGT
 AGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATT
 ATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACCTGGAAATTA
 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

DILLTQSPVILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSR
 FSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPITTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK
 ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGQVQLQQS
 GAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGTNYNQKFKDKA
 TLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGS
 GGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKLAGS
 VPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR* (SEQ ID
 NO: 298)

- 10 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

GACATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCT
 TTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAA
 CGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGC
 TTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAAAGCGAAG
 ATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCAC
 CAAACTGGAACCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGG
 CTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTCAGGTTGAGCTGCAGCAGAGC
 GGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATA
 CCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCCGGGTCAGGGTCTGGAATGGAT
 TGGTTATATCAATCCGAGCCGTTGGTTATACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCA
 ACCCTGACCACCGATAAAAAGCAGCAGCACCCGCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAG
 AGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATCACTATAGCCTGGATTATTG
 GGGTCAGGGCACCCCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCA
 GGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGG
 GTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCA
 GCAGAAAAGCGGCACCAGCCGAAAACGTTGGATTATGATAACCAGCAAACTGGCAAGCGGT
 GTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTA
 TGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTT
 TGGTAGTGGCACCAAACTGGAAATTAATCGTTAG (SEQ ID NO: 299)

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

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGGLEWIGYINPSRGYTNYN
 QKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGG
 GSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYD
 TSKLASGVPAPHFRRGSGSGTSYSILTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGG
 GSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDY
 NTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAA
 STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
 VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 300)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

10

CAGGTT CAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGA
 GCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGGTTAAACAGCGTCC
 GGGTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAAC
 CAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAAGCAGCAGCACC CGCCTATATGC
 AGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGA
 TCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGT
 CAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGT
 TAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCGAAACGTTGGATTTATGAT
 ACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACAATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCAT
 ATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTG
 GTC AAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACCTGGAAATTAATCGTGGAGGTGGT
 GGATCCCAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGC CCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGA
 GCATTACCTGCACCGT GAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCA
 GAGCCCCGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTAT
 AACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAGCCAGGTGTTTT
 TTA AATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGAC
 CTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGCACCGTGAGCGCGGCT
 AGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA
 CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAA
 CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTTACAGTCTTCAGGACTC
 TACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
 GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
 TGACAAAACCTCACACATGCCACCGT GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC
 TTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGT
 GTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
 AAGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCA
 GCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTC
 CTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
 CTCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 301)

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

QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNT
 PFTSRLSINKDNSKSVVFKMNSLQSQDTA IYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAAST

KGPSVFPLAPSSKSTS GGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGA
 SVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSS
 TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSGQIVL
 TQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSG
 SGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR* (SEQ ID NO: 302)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGCCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATT
 CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATFGGGTGCGCCAGAGCCC
 GGGCAAAGCCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGCGGCAACACCGATTATAACACC
 CCGTTTACCAGCCGCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTAAAA
 TGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATTA
 TGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGCACCTGAGCGCGGCTAGCACC
 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
 CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGG
 CGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGCACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
 TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTC
 TTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
 GGTGCATAANTGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
 CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGC
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 GGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCCTCCTCCCTGTCTCCGG

GTAAAGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTT CAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGG
 ATCAGGCGGAGGT CAGGTT CAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCA
 AGCGTTAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGG
 TTAAACAGCGTCCGGGT CAGGGTCTGGAATGGATTGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTA
 TACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAAGCAGCAGC
 ACCGCCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCAC
 GCTATTATGATGATCACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCACCTGACCCTTAG
 CAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTT CAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTG
 ACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGGGTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCG
 CCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCCGAAACG
 TTGGATTTATGATAACCAGCAAACCTGGCAAGCGGTGTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGT
 AGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTATGGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATT
 ATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTTTGGTAGTGGCACCAAACCTGGAAATTA
 TCGTTGA (SEQ ID NO: 303)

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

5

DI LLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSR
 FSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPS VFI FPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGQVQLQQS
 GAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA
 TLTTDKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQTTTLTVSSGGGSGGGGS
 GGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAG
 VPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR* (SEQ ID
 NO: 298)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

GACATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCT
 TTAGCTGCCGCGGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAA
 CGGCAGCCCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGC
 TTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCTTGAGCATTAAACAGCGTGGAAAGCGAAG
 ATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCAC
 CAAACTGGAAC TGAAACGTACGGTGGCTGCACCACTCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT

10

GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCAGG
 CTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTGAGGTTTCAGCTGCAGCAGAGC
 GGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATA
 CCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCCGGGTGAGGGTCTGGAATGGAT
 TGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCA
 ACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCCGCTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAG
 AGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATCACTATAGCCTGGATTATTG
 GGGTCAGGGCACCACCCTGACCGTTAGCAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTC
 GCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATTATGAGCGCAAGTCCGG
 GTGAAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAAATGGTATCA
 GCAGAAAAGCGGCACCAGCCCAGAAACGTTGGATTTATGATACCAGCAAACTGGCAAGCGGT
 GTTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTA
 TGAAGCAGAAGATGCAGCAACCTATTATTGTTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTT
 TGGTAGTGGCACAAACTGGAATTAATCGTTAG (SEQ ID NO: 299)

Anticuerpo C225v5(N297Q) de cadena pesada
 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

5 QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNT
 PFTSRLSINKDNSKQVFFKMNLSQSDTAIYYCARALTYDYEFAYWQGTLVTVSAAST
 KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLIMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 336)

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

10 CAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATT
 CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCC
 GGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTATAACACC

CCGTTTACCAGCCGCTGAGCATTAAACAAAAGATAACAGCAAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAA
 TGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTATTATTGCGCGCGCGCTGACCTATTA
 TGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACC
 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
 CCGTGGGCTGCCGTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGG
 CGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
 TGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCACCCTGCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTC
 TTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCGTCTTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT
 CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGC
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAATGA (SEQ ID NO: 337)

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

5

QQQSGQCISPRGCPDGPVVMYSSGGSGGSGGLSGRSDNHGSSGTQILLTQSPVILSVS
 PGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLIS
 NSVESEDIADYQCQNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 304)

NUCEEOTIDE SEQUENCE

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCATCTCACCTCGTGGTTGTCCGGACGGCCCATACGTCATGT
 ACGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGATCCGGTCTGAGCGGCCGTTCCGATAA
 TCATGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGC
 CCGGGCCAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATT

10

GGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCAT
TAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCCTGAGCATT
AACAGCGTGAAAGCGAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGA
CCACCTTTGGCGCGGGCACCAAACTGGAACGTAACCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT
CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
GTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG
CACCTGAGCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACC
CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGAT
CTGGAGGTGGCGGTTCCAGGCTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCGGAGGTCA
GGTTCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAAATGAGC
TGTAAGCAAGCGGTTATACCTTTACCCGTTATACCATGCATTGGGTTAAACAGCGTCCGG
GTCAGGGTCTGGAATGGATTGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAACCA
GAAATTCAAAGATAAAGCAACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCCGCTATATGCAG
CTGAGCAGCCTGACCTCAGAGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATC
ACTATAGCCTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCCCTGACCCTTAGCAGCGGTGGTGGTGG
TAGTGGTGGCGGTGGTTCAGGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCA
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

DILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSR
FSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 314)

10

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

GACATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCT
 TTAGCTGCCGCGGGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAA
 CGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGC
 TTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAAAGCGAAG
 ATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTGGCGGGGCAC
 CAAACTGGAAGTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGCGGTTTCCAGG
 CTCTGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGATCAGGCCGAGGTTCAGGTTTACGCTGCAGCAGAGC
 GGTGCAGAACTGGCACGTCCGGGTGCAAGCGTTAAATGAGCTGTAAAGCAAGCGGTTATA
 CCTTTACCCGTTTATACCATGCATTGGGTAAACAGCGTCCGGGTCAGGGTCTGGAATGGAT
 TGGTTATATCAATCCGAGCCGTGGTTATACCAACTACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCA
 ACCCTGACCACCGATAAAAGCAGCAGCACCCGCCATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCAG
 AGGATAGCGCAGTTTATTACTGTGCACGCTATTATGATGATCACTATAGCCTGGATTATTG
 GGGTCAGGGCACCACCCTGACCCTTAGCAGCGGTGGTGGTGGTAGTGGTGGCGGTGGTTCA
 GGCGGTGGCGGTAGCCAGATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAATPATGAGCGCAAGTCCGG
 GTGAAAAGTTACCATGACCTGTAGCGCCAGCAGCAGCGTTAGCTATATGAATTGGTATCA
 GCAGAAAAGCGGCACCAGCCGAAACGTTGGATTATATGATACCAGCAAACCTGGCAAGCGGT
 GTCCGGCACATTTTCGTGGTAGCGGTAGCGGCACCTCATATAGCCTGACCATTAGCGGTA
 TGGAAAGCAGAAGTGCAGCAACCTATTATTGTCAGCAGTGGTCAAGCAATCCGTTTACCTT
 TGGTAGTGGCACCAAACCTGGAATTAATCGTTAG (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 multiespecífico o un anticuerpo multiespecífico 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 multiespecíficos y anticuerpos activables multiespecíficos 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.

10

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.

15

20

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.

30

35

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).

5 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

10 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.

15 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-ficoeritina (SAFE). También se analizó un control isotípico, a saber, IgG₁ humana; control isotípico, Enzo. Catálogo ALX-804-133-C100.

20 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-Ficoeritina (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.

35 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

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

45 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.

50 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.

65 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 concentradas 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.

10 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 Prisma con análisis de ajuste de curva log(agonista) vs. respuesta (tres parámetros).

20 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-OKT3rn-H-N para determinar su capacidad de unirse a células SW480 que expresan EGFR.

40 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 MabSlect 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).

60 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⁺

5 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⁺.

10 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 15 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 MF1 experimental y se graficó en Prism con análisis de ajuste de curva log(agonista) vs. respuesta (tres parámetros i.)

20 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

30 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.

40 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.

45 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 EOPR, 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 50 activación de células T.

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

55 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.

60 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-O.KT3m-H-N, el anticuerpo anti-CD3 ϵ OKT3, el anticuerpo anti-EGFR C225v5, y un control de isotipo como se describe en esta 65

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
tcqaqcqccc 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 accagggcc atcggtc 27

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

20 <220>
 <223> Primer HCRevOL

<400> 4
 ctttaccqgq agacaggag aggctcttct qc 32

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

30 <220>
 <223> Primer OKRZVNot

<400> 5
 ctcqaqcqgc cqctcaacqa ttaattcca gtttg 35

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

 Asn Tyr Gly Val His
 1 5
 60
 <210> 13
 <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
<213> Secuencia artificial

25
<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
<213> Secuencia artificial

60

ES 2 912 932 T3

<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

		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>
 20 <223> secuencia escindible

 <400> 34

 Arg Gly Pro Ala Phe Asn Pro Met
 1 5

 25 <210> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> secuencia escindible

 <400> 35

 35 Ser Ser Arg Gly Pro Ala Tyr Leu
 1 5

 40 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> secuencia escindible

 <400> 36

 Arg Gly Pro Ala Thr Pro Ile Met
 1 5

 50 <210> 37
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> secuencia escindible

 <400> 37

 Arg Gly Pro Ala
 1

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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <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
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> secuencia de enlace escindible

 <400> 47
 Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly
 1 5
 55
 <210> 48
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60

ES 2 912 932 T3

<220>
 <223> secuencia de enlace escindible

5 <400> 48

Pro Arg Phe Arg Ile Ile Gly Gly
 1 5

10 <210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> secuencia de enlace escindible

<400> 49

Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp
 1 5

20 <210> 50
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> secuencia de enlace escindible

<400> 50

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

30 <210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> secuencia de enlace escindible

40 <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
 <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
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

ES 2 912 932 T3

<223> secuencia de enlace escindible
<400> 53

5 Ile Glu Gly Arg
 1

<210> 54
<211> 4
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de enlace escindible

15 <400> 54

 Ile Asp Gly Arg
 1

20 <210> 55
<211> 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
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> secuencia de enlace escindible

<400> 56

40 Pro Leu Gly Leu Trp Ala
 1 5

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de enlace escindible

50 <400> 57

 Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln
 1 5

55 <210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <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

20 <210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> secuencia de enlace escindible

<400> 60

30 Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Ile
1 5

<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

45 <210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

		Ala	Gln	Phe	Val	Leu	Thr	Glu	Gly							
		1				5										
5	<210>	74														
	<211>	8														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
10	<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									
25		1				5										
	<210>	76														
	<211>	8														
	<212>	PRT														
30	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
	<223>	fracción de enmascaramiento														
	<400>	76														
35		Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys	Gly							
		1				5										
	<210>	77														
	<211>	15														
40	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
	<223>	fracción de enmascaramiento														
45	<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					

ES 2 912 932 T3

<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
 <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

 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 <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
 <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

 <220>
 55 <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

5 <210> 84
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <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

15 <210> 85
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <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

25 <210> 86
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <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

35 <210> 87
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento
 <400> 87

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

50

ES 2 912 932 T3

1 5 10 15

Cys Pro Gly

<210> 88
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

10

<400> 88

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

Cys Pro Gly

<210> 89
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

20

<400> 89

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

Cys Pro Gly

<210> 90
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

30

<400> 90

35

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

Cys Pro Gly

<210> 91
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

45

<400> 91

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

Cys Pro Gly

ES 2 912 932 T3

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

 40 <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

 Cys Gly

 45 <210> 96
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 <400> 96

 Cys Gly

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

30

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

ES 2 912 932 T3

<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

20
 Cys Gly

<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

45
 Cys Gly

<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

25

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

30

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MSC
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser Asn o Pro

35

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MSC
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser His, Val o Phe

40

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MSC
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser Tyr o Thr

45

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MSC
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser Phe, Trp, Thr o Leu

50

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MSC
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser Tyr, Gly, Thr o Ser

55

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MSC
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser Thr, Ser, Tyr o His

<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

5 <210> 107
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <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

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

20 <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

25 <210> 109
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <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

35 <210> 110
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <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

45 <210> 111
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

ES 2 912 932 T3

<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
 <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

30
 Cys Asn Leu Trp Val Ser Gly Gly Asp Cys Gly Gly Leu Gln Gly
 1 5 10 15

<210> 114
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35
 <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>

ES 2 912 932 T3

<223> fracción de enmascaramiento

<400> 116

5 Cys Phe Leu Tyr Ser Cys Thr Asp Val Ser Tyr Trp Asn Asn Thr
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
<211> 15
<212> PRT
20 <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
1 5 10 15

30 <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
45 <213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> fracción de enmascaramiento

<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

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

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

10

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 122

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

<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
40	1				5					10					15

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

45

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

<400> 125

	Cys	Asn	Leu	Trp	Leu	His	Gly	Gly	Asp	Cys	Arg	Gly	Trp	Gln	Gly
50	1				5					10					15

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

55

<220>
 <223> fracción de enmascaramiento

60

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 <400> 134														
		Cys	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Cys	Asn	Asp	Val	Ser	Tyr	Trp	Ser	Asn	Thr
		1				5					10					15
35		<210> 135 <211> 12 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
40		<220> <223> fracción de enmascaramiento <400> 135														
		Cys	Phe	Leu	Tyr	Ser	Cys	Thr	Asp	Val	Ser	Tyr	Trp			
		1				5					10					
45		<210> 136 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
50		<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
55		<210> 136 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
60		<220> <223> fracción de enmascaramiento <400> 136														

ES 2 912 932 T3

<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

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

 <220>
 20 <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

ES 2 912 932 T3

<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

ES 2 912 932 T3

<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

Glu Ala Val Gly
 20

10

<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

Glu Ala Val Gly
 20

25

<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

5 <210> 155
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <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

15 <210> 156
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <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

25 <210> 157
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

35 <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

40 <210> 158
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <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

5 <210> 159
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <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

15 <210> 160
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <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

25 <210> 161
<211> 18
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> fracción de enmascaramiento

35 <400> 161

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

Thr Gly

40 <210> 162
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <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

5 <210> 163
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

10 <400> 163

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

Gly Gly

15 <210> 164
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <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

25 <210> 165
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

35 <400> 165

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

Ser Gly

40 <210> 166
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

45 <400> 166

ES 2 912 932 T3

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

5

<400> 167

10

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

15

20

<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

25

30

<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

35

Pro Gly

<210> 170
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

40

45

<400> 170

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

Thr Gly

ES 2 912 932 T3

<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

ES 2 912 932 T3

<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														
		<220> <223> fracción de enmascaramiento														
10		<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
30		<210> 187 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
		<220> <223> fracción de enmascaramiento														
35		<400> 187														
		Trp	Arg	Ser	Cys	Asn	Trp	Asn	Tyr	Ala	His	Ile	Phe	Leu	Asp	Cys
		1				5					10					15
40		<210> 188 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
		<220> <223> fracción de enmascaramiento														
45		<400> 188														
		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														
		<220> <223> fracción de enmascaramiento														
55		<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														
	Ser	Arg	Ser	Cys	Ile	Trp	Asn	Tyr	Ala	His	Ile	His	Leu	Asp	Cys
	1				5					10					15
25	<210> 192 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
30	<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
35	<210> 193 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
40	<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
45	<210> 194 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
50	<220> <223> fracción de enmascaramiento <400> 194														
	Tyr	Gly	Ser	Cys	Ser	Trp	Asn	Tyr	Val	His	Ile	Phe	Met	Asp	Cys
	1				5					10					15
55	<210> 194 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
60	<220> <223> fracción de enmascaramiento <400> 194														

ES 2 912 932 T3

<210> 195
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <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

 <210> 196
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 20 <400> 196

	Tyr	Lys	Ser	Cys	His	Trp	Asp	Tyr	Val	His	Ile	Phe	Leu	Asp	Cys
	1				5					10					15

 <210> 197
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 30 <400> 197

	Tyr	Gly	Ser	Cys	Thr	Trp	Asn	Tyr	Val	His	Ile	Phe	Met	Glu	Cys
	1				5					10					15

 <210> 198
 <211> 15
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 45 <400> 198

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

 <210> 199
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> fracción de enmascaramiento

 55 <400> 199

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

 60

ES 2 912 932 T3

<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>

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

ES 2 912 932 T3

<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>

ES 2 912 932 T3

<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>

<223> fracción de enmascaramiento

25 <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 <210> 220

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Pro Phe Pro Ala His Trp Val Pro Asn Thr
1 5 10 15

<211> 16

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<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

ES 2 912 932 T3

<210> 221
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <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

 <210> 225
 <211> 19
 55 <212> PRT

ES 2 912 932 T3

<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
 <213> Secuencia artificial

25

<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>

ES 2 912 932 T3

<223> Anticuerpo CTLA-4 scFv Antihumano

<400> 229
 ggaggtggat ctggaggtgg cggttcaggc tctggcggag gctcaggtgg tggaggatca 60
 ggcggaggtg aaattgtgtt gacacagtct ccaggcacc tgtctttgtc tccaggggaa 120
 agagccacc tctcctgcag gcccagtcag agtgtagca gcagctactt agcctggtac 180
 cagcagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcatctatg gtgcatccag cagggccact 240
 ggcattccag acaggttcag tggcagtggt tctgggacag acttcaactt caccatcagc 300
 agactggagc ctgaagattt tgcagtgat tactgtcagc agtatggtag ctcaccgctc 360
 actttcggcg gagggaccaa ggtggaaatc aaacgttccg gagggtcgac cataacttcg 420
 tataatgtat actatacgaa gttatcctcg agcggtagcc aggtgcagct ggtgcagact 480
 gggggaggcg tggccagcc tgggaggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggatcc 540
 accttagca gctatgcat gagctgggtc cgccaggctc caggggaagg gctggagtgg 600
 gtctcagcta ttagtggtag tggtggtagc acatactacg cagactccgt gaagggccgg 660
 ttcaccatct ccagagacaa ttccaagaac acgctgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga 720
 gccgaggaca cggccgtata ttactgtgcg acaactccc ttactggta 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

15

<400> 230
 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

ggaggtgat ctggaggtgg cggttcaggc tctggcggag gctcaggtgg tggaggatca 60

ggcggaggtc aggttcagct gcagcagagc ggtgcagaac tggcacgtcc ggggtcaagc 120

gttaaaatga gctgtaaagc aagcggttat acctttaccc gttataccat gcattggggtt 180

5

10

ES 2 912 932 T3

aaacagcgtc cgggtcaggg tctggaatgg attggttata tcaatccgag ccggtggttat 240
 accaactaca accagaaatt caaagataaa gcaaccctga ccaccgataa aagcagcagc 300
 accgcctata tgcagctgag cagcctgacc tcagaggata ggcagttta ttactgtgca 360
 cgctattatg atgatcacta ttgcctggat tattgggggtc agggcaccac cctgaccgtt 420
 agcagcggtg gtggtggtag tgggtggcggg ggttcaggcg gtggcggtag ccagattggt 480
 ctgaccacaga gtcggcaat tatgagcgcga agtccgggtg aaaaagttac catgacctgt 540
 agcgcacagca gcacgcttag ctatatgaat tggatcagc agaaaagcgg caccagcccg 600
 aaacgttggg tttatgatac cagcaactg gcaagcggtg ttccggcaca ttttcgtggt 660
 agcggtagcg gcacctcata tagcctgacc attagcggta tggaaagcaga 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 ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtgtcaagt attgaccocg aaggtcggca gacatattac 180

gcagactcog tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacatc 300

ggcggcaggc cggcctttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctcagct 360

agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480

ES 2 912 932 T3

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccgg ctgtcctaca gtccctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa gaaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgc ctgcaccagg actgggtgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaagggc 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

5

<220>
<223> Anticuerpo de cadena pesada 4D11v2 Antihumano conjugado

10

<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

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 tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgcg gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggtatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag acggttgtgg cgctccggtt attcggccaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgttctcat cttcccgcc	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgancaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt	642

<210> 236

<211> 214

ES 2 912 932 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Anticuerpo de cadena ligera 4D11v2 Antihumano conjugado

10 <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

20

ES 2 912 932 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo de cadena pesada conjugado Antihumano 4D11

5

<400> 237

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt cgcacagcct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggtgtcaagt attgaccocg aaggtcggca gacatattac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacatc      300
ggcggcaggt cggcctttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctcctcagct      360
agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc      420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg      480
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga      540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac      600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaa      660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg      720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag      780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      960
tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccca 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 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

ES 2 912 932 T3

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo activable anti-jagged5342-1204-4D11v2

5

<400> 239

```
caaggccagt ctggccagt caatatttg 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 tggcagtgga tctgggacag atttcaactct caccatcagc     360
agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcaac agacggttgt ggcgcctccg      420
ttattcggcc aagggaccaa ggtggaaatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc      480
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg      540
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tgataacgc cctccaatcg      600
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc      660
agcacctga cgtgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc      720
accatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt              774
```

10

<210> 240

<211> 258

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo activable anti-jagged5342-1204-4D11v2

<220>

<221> característica_miac

<222> (226)..(226)

20

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<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

5 <210> 241
 <211> 2139
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cadena pesada de anticuerpo multiespecifico anti-jagged4D11v2 anti CD3 OKT3

ES 2 912 932 T3

<400> 241

gaggtgcacc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt cggccaggct	120
ccaggaagg ggcctggagt ggtgtcaagt attgaccgg aaggtcggca gacatattac	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacatc	300
ggcggcaggc cggcctttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctccctcagct	360
agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctcagc	780
gtcaccatgc tgggtgggga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactgttac	840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actgggtgaa tggcaaggag	960
tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa	1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggcg 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 gggtaaagga ggtggatctg gaggtggcgg ttcaggctct	1380
ggcggaggct caggtggtgg aggatcaggc ggaggtcagg ttcagctgca gcagagcggc	1440

ES 2 912 932 T3

gcagaactgg cacgtccggg tgcaagcgtt aaaatgagct gtaaagcaag cggttataacc 1500
 tttaaccggtt 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 agcggtagtg gtggtagtgg tggcggtagt 1800
 tcaggcggtg gcggtagcca gattgttctg acccagagtc cggcaattat gagcgcgaagt 1860
 ccgggtgaaa aagttacat gacctgtagc gccagcagca gcgttagcta tatgaattgg 1920
 tatcagcaga aaagcggcac cagcccgaag cgttggattt atgataccag caaactggca 1980
 agcggtagtgc cggcacattt tcgtggtagc ggtagcggca cctcatatag cctgaccatt 2040
 agcggtagtgc aagcagaaga tgcagcaacc tattattgtc agcagtggtc aagcaatccg 2100
 tttaaccttg gtagtggcac caaactggaa attaactgt 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

5

10

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
 145 150 155 160

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
 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 agctatntaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgcg gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag acggttgtgg cgctccggtt attcggccaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtottcat cttcccgcc	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttetat	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 ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtggaggtgg atctggaggt 660
 ggcggttcag gctctggcgg aggctcaggt ggtggaggat caggcggagg tcaggttcag 720
 ctgcagcaga gcggtgcaga actggcacgt ccgggtgcaa gcgttaaaat gagctgtaaa 780
 gcaagcgggtt 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
 tattgcctgg attattgggg tcagggcacc accctgaccg ttagcagcgg tgggtggtgg 1080
 agtggtggcg gtggttcagg cgggtggcgt agccagattg ttctgacca gagtccggca 1140
 attatgagcg caagtccggg tgaaaaagt accatgacct gtagcgccag cagcagcgtt 1200
 agctatatga attggtatca gcagaaaagc ggcaccagcc cgaaacgttg gatttatgat 1260
 accagcaaac tggcaagcgg tgttccggca cattttcgtg gtagcggtag cggcacctca 1320
 tatagcctga ccattagcgg tatggaagca gaagatgcag caacctatta ttgtcagcag 1380
 tggtaagca atccgtttac 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

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 ggtggtctga gggccggtc cgataatcat 120

ggcggcgggt ctgacatcca gatgaccag tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga 180

gacagagtca ccatcacttg ccgggcaagt cagagcatta gcagctattt aaattggtat 240

ES 2 912 932 T3

cagcagaaac cagggaaagc ccctaagctc ctgatctatg cggcatccag tttgcaaagt 300
 ggggtcccat caaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcaactct caccatcagc 360
 agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcaac agacggttgt ggcgcctccg 420
 ttattcggcc aagggaccaa ggtggaatc aaacgtacgg tggtgcacc atctgtcttc 480
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 540
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaggg tggataacgc cctccaatcg 600
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 660
 agcaccctga cgctgancaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 720
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtggagg 780
 ggatctggag gtggcggttc aggctctggc ggaggtcag gtggtggagg atcaggcgga 840
 ggtcaggttc agctgcagca gagcgggtca gaactggcac gtccgggtgc aagcgttaa 900
 atgagctgta aagcaagcgg ttataccttt acccggtata ccatgcattg ggttaaacag 960
 cgtccgggtc agggtctgga atggattggt tatatcaatc cgagccgtgg ttataccaac 1020
 tacaaccaga aattcaaaga taaagcaacc ctgaccaccg ataaaagcag cagcaccgcc 1080
 tatatgcagc tgagcagcct gacctcagag gatagcgcag tttattactg tgcacgctat 1140
 tatgatgac actattgcct ggattattgg ggtcagggca ccacctgac cgttagcagc 1200
 ggtggtggtg gtagtggtgg cggtggttca ggcggtggcg gtagccagat tgttctgacc 1260
 cagagtcagg caattatgag cgcaagtcgg ggtgaaaaag ttacatgac ctgtagcggc 1320
 agcagcagcg ttagctatat gaattggtat cagcagaaaa gcggcaccag cccgaaacgt 1380
 tggatttatg ataccagcaa actggcaagc ggtgttccgg cacattttcg tggtagcgg 1440
 agcggcacct catatagcct gaccattagc ggtatggaag cagaagatgc agcaacctat 1500
 tattgtcagc agtggccaag caatccgttt acctttggtg gtggcaccaa actggaatt 1560
 aatcgt 1566

<210> 246

<211> 522

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera de Anticuerpo activable multiespecífico 5342-1204-4D11v2-CD3 OKT3 anti-jaggedanti CD3

<220>

<221> característica_msc

<222> (226)..(226)

15 <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

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo multiespecifica anti-jagged4D11v2 anti CTLA-4

<400> 247

gaggtgcacc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccagget	120
ccaggaagg ggctggagtg ggtgtcaagt attgaccogg aaggtcggca gacatattac	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacatc	300
ggcggcaggt cggcctttga ctactgggyc caggaaccc tggtcaccgt ctcctcagct	360
agcaccaagg gcccatcggc ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag	780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagt caactgttac	840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actgggtgaa tggcaaggag	960
tacaagtgca aggtctcaa 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 ccctgtctcc gggtaaagga ggtggatctg gaggtggcgg ttcaggetct	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 acogctcact ttcggcggag ggaccaaggt ggaaatcaaa 1740
cgttccggag ggtcgacat aacttcgtat aatgtatact atacgaagt atcctcgagc 1800
ggtaccaggg tgcagctggt gcagactggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg 1860
agactctcct gtgcagcctc tggatccacc tttagcagct atgccatgag ctgggtcccgc 1920
caggctccag ggaaggggct ggagtgggtc tcagctatta gtggtagtgg tggtagcaca 1980
tactacgcag actccgtgaa gggccggtc accatctcca gagacaattc caagaacacg 2040
ctgtatctgc aatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaca 2100
aactcccttt actggtactt cgatctctgg ggccgtggca ccctggtcac tgtctcttca 2160
gc 2162

<210> 248
<211> 722
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <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

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 multiespecifico 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 agctatntaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgcg gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag acggttgtgg cgcctccgtt attcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa acgtacggtg gctgcacat 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 atctggagggt 660
 ggcggttcag gctctggcgg aggctcaggt ggtggaggat caggcggagg tgaaattgtg 720
 ttgacacagt ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg aaagagccac cctctcctgc 780
 agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcctggt accagcagaa acctggccag 840
 gctcccaggc tcctcatcta tgggtgatcc agcagggcca ctggcatccc agacaggttc 900
 agtggcagtg ggtctgggac agacttcact ctaccatca gcagactgga gcctgaagat 960
 tttgcagtggt attactgtca gcagtatggt agctcacgcg tcaactttcgg cggagggacc 1020
 aaggtggaaa tcaaacgttc cggaggggtcg accataactt cgtataatgt atactatacg 1080
 aagttatcct cgagcggtac ccagggtcag ctggtgcaga ctgggggagg cgtggtccag 1140
 cctgggagggt ccctgagact ctctgtgca gcctctggat ccaccttag cagctatgcc 1200
 atgagctggg tccgccaggc tccaggaag gggctggagt ggtctcagc tattagtgggt 1260
 agtgggtgta gcacatacta cgcagactcc gtgaagggcc ggttcacat ctccagagac 1320
 aattccaaga acacgctgta tctgcaaatg aacagcctga gagccgagga cacggccgta 1380
 tattactgtg cgacaaactc 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

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera de anticuerpo multiespecífico activable 5342-1204-4D11v2-CTLA-4 anti-jagged anti CTLA-4

<220>

<221> Característica_msc

<222> (677)..(677)

15 <223> n puede ser cualquier aminoácido

<400> 251

ES 2 912 932 T3

caaggccagt 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 aagggaccaa ggtggaaatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 480
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 540
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaaag tggataacgc cctccaatcg 600
 ggttaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 660
 agcaccctga cgctgancaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 720
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtggaggt 780
 ggatctggag gtggcggttc aggctctggc ggaggctcag gtggtggagg atcaggcgga 840
 ggtgaaattg tgttgacaca gtctccaggc accctgtctt tgtctccagg ggaaagagcc 900
 accctctcct gcagggccag tcagagtgtt agcagcagct acttagcctg gtaccagcag 960
 aaacctggcc aggtcccag gctcctcatc tatggtgcat ccagcagggc cactggcatc 1020
 ccagacaggt tcagtggcag tgggtctggg acagacttca ctctcaccat cagcagactg 1080
 gagcctgaag attttgcagt gtattactgt cagcagtatg gtagctcacc gctcactttc 1140
 ggcggagggga ccaaggtgga aatcaaactg tccggagggt cgaccataac ttcgtataat 1200
 gtatactata cgaagttatc ctogagcggg acccaggtgc agctggtgca gactggggga 1260
 ggcgtggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg atccaccttt 1320
 agcagctatg ccatgagctg ggtccgccag gctccagggg aggggctgga gtgggtctca 1380
 gctattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc 1440
 atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag 1500
 gacacggccg tatattactg tgcgacaaa tccctttact ggtacttcca tctctggggc 1560
 cgtggcacc c tggctcactgt 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

5

10

15

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 ggcacagagc 120

ccgggcaaag gcctggaatg gctgggctg atttgagcg gcggcaacac cgattataac 180

accccgttta ccagcgcct gagcattaac aaagataaca gcaaagcca ggtgttttt 240

aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggatacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc 300

tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccg tggtagccgt gagcgcggct 360

agcaccaagg gccatcggc cttccccctg gcaccctcct 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 accaaggtgg acaagaaagt tgagccaaa 660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780

gtcacatgcg tggtagtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

5

10

ES 2 912 932 T3

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
 tacaagtgca 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 ctacacgacg 1320
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaata 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 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
 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

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 ccoggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga acgtgtgagc 60
 ttttagctgcc gcgcgagcca gagcattggc accaacattc attggtatca gcagcgcacc 120
 aacggcagcc cgcgcctgct gattaaatat gcgagcgaaa gcattagcgg cattccgagc 180
 cgctttagcg gcagcggcag cggcacgat tttaccctga gcattaacag cgtggaagc 240
 gaagatattg cggattatta ttgccagcag aacaacaact ggccgaccac ctttggcgcg 300
 ggcaccaaac tggaactgaa acgtacggtg gctgcacat ctgttctcat cttcccgcc 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt 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

```

caggtgcagc tgaacacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt      60
acctgcaccg tgagcggcct tagcctgacc aactatggcg tgcatgggt ggc ccagagc      120
ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac      180
accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaagcca ggtgttttt      240
aaaatgaaca gcctgcaaag caacgatacc gcgatttatt attgocgcgc gcgcctgacc      300
tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccg tggtgaccgt gagcgcggct      360
agcaccaagg gcccatcggg 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 acaagcgcgt tgagcccaa      660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg      720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag      780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      960
tacaagtgca aggtctcaa 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 tgcaacaacca ctacacgacg     1320
aagagcctct cctgtctcc 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

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 attaaatag cgagcgaaag cattagcggc 180

ES 2 912 932 T3

attccgagcc gctttagcgg cagcggcagc ggcaccgatt ttaccctgag cattaacagc 240
 gtggaaagcg aagatattgc ggattattat tgccagcaga acaacaactg gccgaccacc 300
 tttggcgcgg gcaccaaact ggaactgaaa cgtagcgtgg ctgcaccatc tgtcttcac 360
 ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctggtgtgtg cctgctgaat 420
 aacttctatc ccagagaggg caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480
 aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540
 accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600
 catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag 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 tgaaacagag cggccccggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt 60
 acctgcaccg tgagcggctt tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt ggc ccagagc 120
 cggggcaaag gcctggaatg gctgggctg atttggagcg gcggaacac cgattataac 180
 acccgttta ccagccgct gagcattaac aaagataaca gcaaagcca ggtgtttttt 240
 aaaatgaaca gcctgcaaag caacgatacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc 300
 tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcacc tggtgaccgt gagcgcggct 360
 agcaccaagg gccatcgggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
 acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgt ccctccagca gcttggggcac ccagacctac 600
 atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg 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 taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctccaa caaagcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

5

10

ES 2 912 932 T3

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> 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

ES 2 912 932 T3

<211> 645
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpos anti EGFR C225v4

<400> 263

```

cagatcttgc tgaccagag cccggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga 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 ctttgccgcg      300
ggcaccaaac tggaaactgaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgccca      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgetgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                          645
  
```

10

<210> 264
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpos anti EGFR C225v4

20

<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 tgaacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt 60

acctgcaccg tgagcggctt tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt ggcagagc 120

ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gggcaacac cgattataac 180

5

10

ES 2 912 932 T3

accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt 240
 aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggataacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc 300
 tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcacc caggacaccg gagcgcggct 360
 agcaccaagg gccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggc cagacctac 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 aggtcaagt caactgttac 840
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtaccgcagc 900
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actgggtgaa tggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctcaaaa 1020
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgaactg 1080
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc 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> 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

5

10

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 cccggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga acgtgtgagc 60

tttagctgcc gcgagagcca gagcattggc accaacattc attggtatca gcagcgcacc 120

aacggcagcc cgcgcctgct gattaaatat gcgagcgaaa gcattagcgg cattccgagc 180

cgcttttagcg gcagcggcag cggcaccgat tttaccctga gcattaacag cgtggaaagc 240

gaagatattg cggattatta ttgccagcag aacaacaact ggccgaccac ctttgccgcg 300

ggcaccaaac tggaactgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgccca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagtg gataacgcc 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 cgtggtgtc cggacggccc atacgtcatg	60
tacggctcga gcggtggcag cgggtggtct 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 ccgctttagc ggcagcggca gcggcaccga tttaccctg	360
agcattaaca gcgtggaaag cgaagatatt gcggattatt attgccagca gaacaacaac	420
tggccgacca cctttggcgc gggcaccaaa ctggaactga aacgtacggt ggctgcacca	480
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgtgtg	540
tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtgggaagg ggataacgcc	600
ctccaatcgg gtaactcca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac	660
agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacaaa 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

ES 2 912 932 T3

<400> 271

caggtgcagc tgaaacagag cggccccggc 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 cagggcacc tggtgaccgt gagcgcggct	360
agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtg	480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
tcagtcttc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag	780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960
tacaagtgca aggtctcaa 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
 ttaccocggt ataccatgca ttgggttaaa cagcgtccgg gtcagggctc 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 agcggtagtg gtggtagtgg tggcggtagt 1800
 tcaggcggtg gcggtagcca gattgttctg acccagagtc cggcaattat gagcgcgaagt 1860
 ccgggtgaaa aagttacat gacctgtagc gccagcagca gcgttagcta tatgaattgg 1920
 tatcagcaga aaagcggcac cagcccgaaa cgttggattt atgataccag caaactggca 1980
 agcggtagtc cggcacattt tcgtggtagc ggtagcggca cctcatatag cctgaccatt 2040
 agcggtagtg aagcagaaga tgcagcaacc tattattgtc agcagtggtc aagcaatccg 2100
 ttacccttg 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
 145 150 155 160

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
 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 multiespecificos anti EGFR C225v5 anti CD3 OKT3

<400> 273

cagatcttgc tgaccagag cccggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga 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 tggaaactgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taactttat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagtg 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
ggcggttcag gctctggcgg aggctcaggt ggtggaggat caggcggagg tcaggttcag	720
ctgcagcaga gcggtgcaga actggcacgt ccggtgcaa gcgttaaaat gagctgtaaa	780

ES 2 912 932 T3

gcaagcgggtt atacctttac ccgttataacc atgcattggg ttaaacagcg tccgggtcag 840
 ggtctggaat ggattgggta tatcaatccg agccgtgggtt ataccaacta caaccagaaa 900
 ttcaaagata aagcaaccct gaccaccgat aaaagcagca gcaccgccta tatgcagctg 960
 agcagcctga cctcagagga tagcgcagtt tattactgtg cacgctatta tgatgatcac 1020
 tattgcctgg attattgggg tcagggcacc accctgaccg ttagcagcgg tgggtggtggt 1080
 agtgggtggcg gtggttcagg cgggtggcggg agccagattg ttctgaccca 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
 tggccaagca atccggtttac ctttggtagt ggcaccaaac tggaaattaa tcgt 1434

<210> 274
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecificos 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	ctggccagtg	catctcacct	cgtggttgtc	cggacggccc	atacgtcatg	60
tacggctcga	gcggtggcag	cggtggtctc	ggtggatccg	gtctgagcgg	ccgttccgat	120
aatcatggca	gtagcggtac	ccagatcttg	ctgaccaga	gcccgggtgat	tctgagcgtg	180
agcccgggcg	aacgtgtgag	ctttagctgc	cgcgcgagcc	agagcattgg	caccaacatt	240
cattggtatc	agcagcgcac	caacggcagc	ccgcgctgct	tgattaaata	tgcgagcgaa	300
agcattagcg	gcattccgag	ccgctttagc	ggcagcggca	gcggcaccga	ttttaccctg	360
agcattaaca	gcgtggaaag	cgaagatatt	gcggattatt	attgccagca	gaacaacaac	420
tggccgacca	cctttggcgc	gggcacccaaa	ctggaactga	aacgtacggt	ggctgcacca	480
tctgtcttca	tcttcccgcc	atctgatgag	cagttgaaat	ctggaactgc	ctctgttggtg	540
tgctgtctga	ataacttcta	tcccagagag	gccaaagtac	agtggaaggt	ggataacgcc	600
ctccaatcgg	gtaactccca	ggagagtgtc	acagagcagg	acagcaagga	cagcacctac	660
agcctcagca	gcaccctgac	gctgagcaaa	gcagactacg	agaaacacaa	agtctacgcc	720
tgcgaagtca	cccacagggg	cctgagctcg	cccgtcacia	agagcttcaa	caggggagag	780

5

10

15

ES 2 912 932 T3

tgtggaggtg gatctggagg tggcggttca ggctctggcg gaggtcagc tgggtggagga 840
 tcaggcggag gtcaggttca gctgcagcag agcgggtcag aactggcacg tccgggtgca 900
 agcgttaaaa tgagctgtaa agcaagcggc tataccttta cccgttatac catgcattgg 960
 gttaaacagc gtccgggtca gggctctgaa tggattgggt atatcaatcc gagccgtggt 1020
 tataccaact acaaccagaa attcaaagat aaagcaacc tgaccaccga taaaagcagc 1080
 agcaccgcct atatgcagct gaggcagctg acctcagagg atagcgcagt ttattactgt 1140
 gcacgtatt atgatgatca ctattgcctg gattattggg gtcagggcac caccctgacc 1200
 gttagcagcg gtggtggtg tagtggtggc ggtggttcag gcggtggcgg tagccagatt 1260
 gttctgaccc agagtccggc aattatgagc gcaagtccgg gtgaaaaagt taccatgacc 1320
 tgtagcgcca gcagcagcgt tagctatatg aattggtatc agcagaaaag cggcaccagc 1380
 ccgaaacggt ggatttatga taccagcaa 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 tgaacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt 60

acctgcaccg tgagcggctt tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt gcgccagagc 120

ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac 180

5

10

ES 2 912 932 T3

accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt 240
 aaaatgaaca gcoctgcaaag ccaggataacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc 300
 tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccg tggtgaccgt gagcgcggct 360
 agcaccaagg gcccatcggg ettecccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccocg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccocg ctgtcctaca gtccctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac 600
 atctgcaacg tgaatcacia gccacgcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa 660
 tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gaccctgag 780
 gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 840
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggatgaactg 1080
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
 gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggtc tcgacaacca ctacacgca 1320
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagga ggtggatctg gaggtggcgg ttcaggctct 1380
 ggcggaggct caggtggtgg aggatcaggc ggaggtgaaa ttgtgttgac acagtctcca 1440
 ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga gccaccctct cctgcagggc cagtcaaggt 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 ggtcgaccat aacttcgtat aatgtatact atacgaagtt atcctcgagc 1800
 ggtaccagcag tgcagctggg gcagactggg ggagggcgtg tccagcctgg gaggtccctg 1860
 agactctcct gtgcagcctc tggatccacc tttagcagct atgccatgag ctgggtccgc 1920
 caggctccag ggaaggggct ggagtggtc tcagctatta gtggtagtgg tggtagcaca 1980
 tactacgcag actccgtgaa gggccggtc accatctcca gagacaatc caagaacagc 2040
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaca 2100
 aactcccttt actggtactt cgatctctgg ggccgtggca ccctggtcac 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 multiespecificos 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

<211> 1461
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecíficos anti EGFR C225v5 anti CTLA-4

<400> 279

cagatcttgc tgaccagag cccggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga 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 tggaaactgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgccca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagtg 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
 ggcggttcag gctctggcgg aggctcaggt ggtggaggat caggcggagg tgaattgtg 720
 ttgacacagt ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg aaagagccac cctctcctgc 780
 agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcctggt accagcagaa acctggccag 840
 gctcccaggc tctcateta tgggtgatcc agcagggcca ctggcatccc agacaggttc 900
 agtggcagtg ggtctgggac agacttcaact ctcacatca gcagactgga gcctgaagat 960
 tttgcagtggt attactgtca gcagtatggt agctcacgcg tcaactttcgg cggagggacc 1020
 aagggtgaaa tcaaacgttc cggagggtcg accataactt cgtataatgt atactatagc 1080
 aagttatcct cgagcggtac ccaggtgcag ctggtgcaga ctgggggagg cgtggtccag 1140
 cctgggaggt cctgagact ctctgtgca gcctctggat ccaccttag cagctatgcc 1200
 atgagctggg tccgccaggc tccaggaag gggctggagt gggctcagc tattagtgg 1260
 agtgggtgta gcacatacta cgcagactcc gtgaagggcc ggttcacat ctccagagac 1320
 aattccaaga acacgctgta tctgcaaatg aacagcctga gagccgagga cacggccgta 1380
 tattactgtg cgacaaactc ctttactgg tacttcgatc tctggggccg tggcaccctg 1440
 gtcactgtct cttcagctag c 1461

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

actggcatcc cagacagggt cagtggcagt gggctctggga cagacttcac tctcaccatc 1080
 agcagactgg agcctgaaga ttttgcagtg tattactgtc agcagtatgg tagctcaccg 1140
 ctcaacttgc gcggagggac caaggtggaa atcaaacggt ccggagggtc gaccataact 1200
 tcgtataatg tatactatac gaagttatcc tcgagcggta cccaggtgca gctgggtgag 1260
 actgggggag gcgtgggtcca gcctgggagg tcctgagac tctcctgtgc agcctctgga 1320
 tccaccttta gcagctatgc catgagctgg gtccgccagg ctccagggaa ggggctggag 1380
 tgggtctcag ctattagtgg tagtgggtgt agcacatact acgcagactc cgtgaagggc 1440
 cggttcacca tctccagaga caattccaag aacacgctgt atctgcaaataaac gaaacagcctg 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

- 5 <210> 283
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> secuencia de codificación de péptido espaciador

- <400> 283
- caagccagctggccag 18

- 15 <210> 284
- <211> 45
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223>secuencia de codificación de péptido de enmascaramiento

- <400> 284
- tgcatctcac ctgctggttg tccqqacqqc ccatacgtca tgtac 45

- 25 <210> 285
- <211> 39
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 30 <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
ctqaqcqcc 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

40 <210> 289
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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 conector 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 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

ES 2 912 932 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo OKT3m scFv con conector largo

5

<400> 291

```
ggaggtggat ctggaggtgg cggttcaggc tctggcggag gctcaggtgg tggaggatca      60
ggcggagggtc aggttcagct gcagcagagc ggtgcagaac tggcacgtcc gggtgcaagc      120
gttaaaatga gctgtaaagc aagcggttat acctttaccg gttataccat gcattggggtt      180
aacagcgtc 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
agcagcgggtg gtggtggtag tggtggcggg ggttcaggcg gtggcggtag ccagattggt      480
ctgaccacaga gtccggcaat tatgagcgcga agtccgggtg aaaaagttac catgacctgt      540
agcggcagca gcagcgttag ctatatgaat tggatcagc agaaaagcgg caccagcccg      600
aaacgttggg tttatgatac cagcaactg gcaagcgggtg ttccggcaca ttttcgtggt      660
agcggtagcg gcacctcata tagcctgacc attagcggta tggaaagcaga agatgcagca      720
acctattatt gtcagcagtg gtcaagcaat ccgtttacct ttggtagtgg caccaaactg      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 tgacagcagag cggtgcagaa ctggcacgtc cgggtgcaag cgtaaataatg 60
 agctgtaaag 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
 ggtggtggta gtggtggcgg tggttcaggc ggtggcggta gccagattgt tctgaccag 420
 agtccggcaa ttatgagcgc aagtccgggt gaaaaagtta ccatgacctg tagcgcacg 480
 agcagcgtta gctatatgaa ttggtatcag cagaaaagcg gcaccagccc gaaacgttg 540
 atttatgata ccagcaaact ggcaagcggg gttccggcac attttcgtgg tagcggtagc 600
 ggcacctcat atagcctgac cattagcggg atggaagcag aagatgcagc aacctattat 660
 tgtcagcagt ggtcaagcaa tccgtttacc tttggtagtg gcaccaaact ggaattaat 720
 cgtggagggtg 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

5

10

ES 2 912 932 T3

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 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

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

caggttcagc tgcagcagag cgggtgcagaa ctggcacgtc cgggtgcaag cgttaaaatg	60
agctgtaaag caagcgggta tacctttacc cgttatacca tgcattgggt taaacagcgt	120
ccgggtcagg gtctggaatg gattggttat atcaatccga gccgtgggta taccaactac	180
aaccagaaat tcaaagataa agcaaccctg accaccgata aaagcagcag caccgcctat	240
atgcagctga gcagcctgac ctacagaggat agcgcagttt attactgtgc acgctattat	300
gatgatcact atagcctgga ttattggggt cagggcacca ccctgaccgt tagcagcggg	360
gggtggtggta gtggtggcgg tggttcaggc ggtggcggta gccagattgt totgaccag	420
agtcgggcaa ttatgagcgc aagtcggggt gaaaaagtta ccatgacctg tagcgcaccg	480

5

10

ES 2 912 932 T3

```

agcagcgtta gctatatgaa ttggtatcag cagaaaagcg gcaccagccc gaaacggttg      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 gcattaacia agataacagc      960
aaaagccagg tgttttttaa aatgaacagc ctgcaaagcc aggataccgc gatttattat     1020
tgcgcgcgcg cgctgaccta ttatgattat gaatttgcgt attggggcca gggcacctcg     1080
gtgaccgtga ggcgggctag caccaagggc ccatcggctc tccccctggc accctcctcc     1140
aagagcacct ctggggggcac aggggcctcg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa     1200
ccggtgacgg tgcctgga ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccgctt     1260
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc     1320
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaaagc ccagcaacac caaggtggac     1380
aagaaagttg agcccaaact ttgtgacaaa actcacacat gccaccctg cccagcacct     1440
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg     1500
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggagc tgagccacga agaccctgag     1560
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg     1620
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac     1680
tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc     1740
gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc     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

5

10

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

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

5

10

ES 2 912 932 T3

caggtgcagc tgaacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt 60
 acctgcaccg tgagcggcct tagcctgacc aactatggcg tgcatgggt gcgccagagc 120
 ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac 180
 acccogttta ccagccgct gagcattaac aaagataaca gaaaagcca ggtgtttttt 240
 aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggataacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc 300
 tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcacc cgggtgaccgt gagcgcgct 360
 agcaccaagg gcccatcgtt cttcccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcagggc ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggc cagacacct 600
 atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa 660
 tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
 gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctcaaaa 1020
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1080
 accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgag 1320
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaagga ggtggatctg gaggtggcgg ttcaggctct 1380
 ggcggaggct caggtgtgag aggatcaggc ggaggtcagg ttcagctgca gcagagcgg 1440
 gcagaactgg cacgtccggg tgcaagcgtt aaaatgagct gtaaagcaag cggttatacc 1500
 tttaccogtt ataccatgca ttgggttaa cagcgtccgg gtcagggctt ggaatggatt 1560
 ggttatatca atccgagccg tggttatacc aactacaacc agaaattcaa agataaagca 1620
 accctgacca ccgataaaag cagcagcacc gcctatatgc agctgagcag cctgacctca 1680
 gaggatagcg cagtttatta ctgtgcacgc tattatgatg atcactatag cctggattat 1740
 tggggtcagg gcaccacct gaccgttagc agcgggtggtg gtggtagtgg tggcgggtgg 1800
 tcaggcgggtg gcggtagcca gattgtctg acccagagtc cggcaattat gagcgcgaagt 1860
 ccgggtgaaa aagttaccat gacctgtagc gccagcagca gcgttagcta tatgaattgg 1920
 tatcagcaga aaagcggcac cagcccgaag cgttggattt atgataccag caaactggca 1980
 agcgggtgtc cggcacattt tcgtggtagc ggtagcggca cctcatatag cctgaccatt 2040
 agcggtatgg aagcagaaga tgacgcaacc tattattgtc agcagtggtc aagcaatccg 2100
 tttacetttg gtagtggcac caaactggaa attaatcgtt ga 2142

ES 2 912 932 T3

<211> 478
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpos multiespecificos 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

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	cttcccgccca	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaactgcc	tctgtttgtg	gcctgctgaa	taacttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	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
ggcggttcag	gctctggcgg	aggctcaggt	ggtggaggat	caggcggagg	tcaggttcag	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	tggtggtggt	1080
agtgggtggcg	gtggttcagg	cgggtggcgt	agccagattg	ttctgacca	gagtcggcca	1140

ES 2 912 932 T3

attatgagcg caagtccggg tgaaaaagtt accatgacct gtagcgccag cagcagcggtt 1200
 agctatatga attggatca gcagaaaagc ggcaccagcc cgaaacggtg gatttatgat 1260
 accagcaaac tggcaagcgg tgttccggca cattttcgtg gtagcggtag cggcacctca 1320
 tatagcctga ccattagcgg tatggaagca gaagatgcag caacctatta ttgtcagcag 1380
 tggccaagca atccgtttac ctttggtagt ggcaccaaac tggaaattaa tcggttag 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

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

ES 2 912 932 T3

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpos multiespecíficos C225v5 N297Q - OKT3m-H-N

<400> 301

caggttcagc	tcagcagag	cggtgcagaa	ctggcacgtc	cggtgcaag	cgttaaaatg	60
agctgtaaag	caagcgggta	tacctttacc	cgttatacca	tgattgggt	taaacagcgt	120
ccgggtcagg	gtctggaatg	gattgggtat	atcaatccga	gccgtgggta	taccaactac	180
aaccagaaat	tcaagataa	agcaaccctg	accaccgata	aaagcagcag	caccgcctat	240
atgcagctga	gcagcctgac	ctcagaggat	agcgcagttt	attactgtgc	acgctattat	300
gatgatcact	atagcctgga	ttattggggt	cagggcacca	ccctgaccgt	tagcagcggg	360
ggggtggtg	gtggtggcgg	tggttcagyc	ggggtgggta	gccagattgt	tctgaccag	420
agtccggcaa	ttatgagcgc	aagtccgggt	gaaaaagtta	ccatgacctg	tagcggcagc	480
agcagcgtta	gctatatgaa	ttggtatcag	cagaaaagcg	gcaccagccc	gaaacgtgg	540
atztatgata	ccagcaaact	ggcaagcggg	gttccggcac	atcttcgtgg	tagcggtagc	600
ggcacctcat	atagcctgac	cattagcggg	atggaagcag	aagatgcagc	aacctattat	660
tgtcagcagt	ggcaagcaa	tccgtttacc	tttggtagtg	gcaccaaact	ggaaattaat	720
cgtggagggtg	gtggatccca	gggtgcagctg	aaacagagcg	gcccgggcct	gggtgcagccg	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	cgctgacctg	ttatgattat	gaatttgcgt	attggggcca	gggcaccctg	1080
gtgaccgtga	gcgcggttag	caccaagggc	ccatcggtct	tccccctggc	accctcctcc	1140
aagagcacct	ctggggggcac	agcggccctg	ggctgcctgg	tcaaggacta	cttccccgaa	1200
ccggtgacgg	tgctgtgaa	ctcaggcgcc	ctgaccagcg	gcgtgcacac	cttccccggt	1260
gtcctacagt	cctcaggact	ctactccctc	agcagcgtgg	tgaccgtgcc	ctccagcagc	1320

ES 2 912 932 T3

ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 1380
aagaaagtgt agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct 1440
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg 1500
atctcccgga cccctgaggt cacatgctg 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 caaaggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1800
ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1860
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatggc agccggagaa caactacaag 1920
accacgcctc cctgtctgga ctccgacgac 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 multiespecificos 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					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	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		

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 multiespecificos C225v5 N297Q - OKT3m-H-C

<400> 303

cagggtgcagc tgaaacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt	60
acctgcaccg tgagcggcct tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt gcgccagagc	120
ccgggcaaag gcctggaatg gctgggctgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac	180
accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaagcca ggtgtttttt	240
aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggatacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc	300
tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccg tggtgaccgt gagcgcggct	360
agcaccaagg gcccatcggc 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 gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720

5

10

ES 2 912 932 T3

tcagtcttcc tcttcccc aaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 780
 gtcacatgcg tgggtggtga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtaccagagc 900
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc 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 ctacacgacg 1320
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaagga ggtgatctg gaggtggcgg ttcaggtctt 1380
 ggcggaggct caggtggtgg aggatcaggc ggaggtcagg ttcagctgca gcagagcgg 1440
 gcagaactgg cacgtccggg tgcaagcgtt aaaatgagct gtaaagcaag cggttatacc 1500
 tttaccctgt ataccatgca ttgggttaaa cagcgtccgg gtcagggctt ggaatggatt 1560
 ggttatatca atccgagccg tggttatacc aactacaacc agaaattcaa agataaagca 1620
 accctgacca ccgataaaag cagcagcacc gcctatatgc agctgagcag cctgacctca 1680
 gaggatagcg cagtttatta ctgtgcacgc tattatgatg atcaactatag cctggattat 1740
 tggggtcagg gcaccaccct gaccgttagc agcgggtggt gtggtagtgg tggcgggtgg 1800
 tcaggcggtg gcggtagcca gattgttctg acccagagtc cggcaattat gagcgcgaag 1860
 ccgggtgaaa aagttacat gacctgtagc gccagcagca gcgttagcta tatgaattgg 1920
 tatcagcaga aaagcggcac cagcccgaag cgttggattt atgataccag caaactggca 1980
 agcgggtgtc cggcacattt tcgtggtagc ggtagcggca cctcatatag cctgaccatt 2040
 agcggtatgg aagcagaaga tgcagcaacc tattattgtc agcagtggtc aagcaatccg 2100
 tttacctttg gtagtggcac caaactggaa attaatcgtt 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

5

10

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

5

10

ES 2 912 932 T3

caaggccagt ctggccagtg catctcacct cgtggttgtc cggacggccc atacgtcatg 60
 tacggctcga gcggtggcag cgggtggctct ggtggatccg gtctgagcgg ccgttccgat 120
 aatcatggca gtagcggtag ccagatcttg ctgaccacaga gcccggtgat tctgagcgtg 180
 agccccggcg 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 agtgggaaggt ggataacgcc 600
 ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 660
 agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 720
 tgcgaagtca 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 aaagcaaccg tgaccaccga taaaagcagc 1080
 agcaccgcct atatgcagct gagcagcctg acctcagagg atagcgcagt ttattactgt 1140
 gcacgtatt atgatgatca ctatagcctg gattattggg gtcagggcac caccctgacc 1200
 gttagcagcg gtggtggtgg tagtggtggc ggtggttcag gcggtggcgg tagccagatt 1260
 gttctgaccc agagtccggc aattatgagc gcaagtccgg gtgaaaaagt taccatgacc 1320
 tgtagcgcga 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

5

<220>
 <223> Anticuerpo OKT3m scFv
 <400> 306

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

caggttcagc tgcagcagag cgggtgcagaa ctggcacgtc cgggtgcaag cgttaaaatg 60
 agctgtaaag 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
 ggtggtggta gtggtggcgg tggttcaggc ggtggcggta gccagattgt tctgaccag 420
 agtccggcaa ttatgagcgc aagtccgggt gaaaaagtta ccatgacctg tagcgcacg 480
 agcagcgtta gctatatgaa ttggtatcag cagaaaagcg gcaccagccc gaaacgtgg 540
 atttatgata 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 gtcgggtga 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

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 cccggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga 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 tggaaactgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtottcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc 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
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtggagggtg atctggaggt 660
 ggcggttcag gctctggcgg aggctcaggt 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 tagcgcagtt tattactgtg cacgctatta tgatgatcac 1020
 tatagcctgg attattgggg tcagggcacc accctgaccg ttagcagcgg tgggtggtgg 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 atccgtttac ctttggtagt ggcaccaaac tggaaattaa tcgtag 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

<210> 317
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> secuencia escindible

25 <400> 317

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

Ile Ser Ser Gly Leu Ser Ser
1 5

35

<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

5

10

ES 2 912 932 T3

caggtgcagc tgaaacagag cggccccggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt 60
 acctgcaccg tgagcggcct tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt ggc ccagagc 120
 ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac 180
 accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaagcca ggtgtttttt 240
 aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggatacc gcgatttatt attgocgcgc gcgctgacc 300
 tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcacc tggtgaccgt gagcgcggct 360
 agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcagcgc cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
 atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaa 660
 tcttgtgaca 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 aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1080
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg 1200
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgacg 1320
 aagagcctct cctgtctccc 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:
- 5 (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;
- 10 (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,
- 15 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;
- 20 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.
- 25
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.
- 30
3. El anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el AB1 es:
- 35 un anticuerpo de acoplamiento de células efectoras inmunitarias;
- un anticuerpo de acoplamiento de leucocitos;
- un anticuerpo de acoplamiento de células T;
- 40 un anticuerpo de acoplamiento de células NK;
- un anticuerpo de acoplamiento de macrófagos; o
- 45 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.
- 50
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.
- 55
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:
- 60 el primer brazo
- comprende un péptido de unión entre el MM1 y el CM1; o
- 65 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

5 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:

10 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;

15 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;

20 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:

25 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

30 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

35 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:

40 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;

45 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;

50 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.

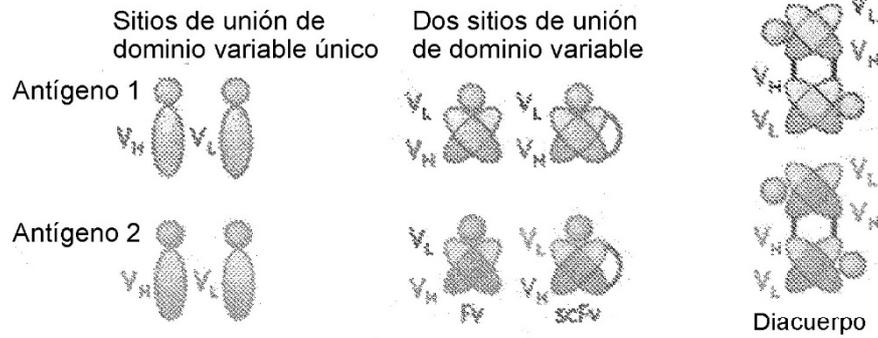
14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo activable biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo.

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:
- 20 (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
- (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
- 35 cáncer

FIGURA 1

De Chan y Carter, *Nat Rev. Immunol.* 2010

Bloques de construcción de unión al antígeno:



Fragmentos de anticuerpos biespecíficos

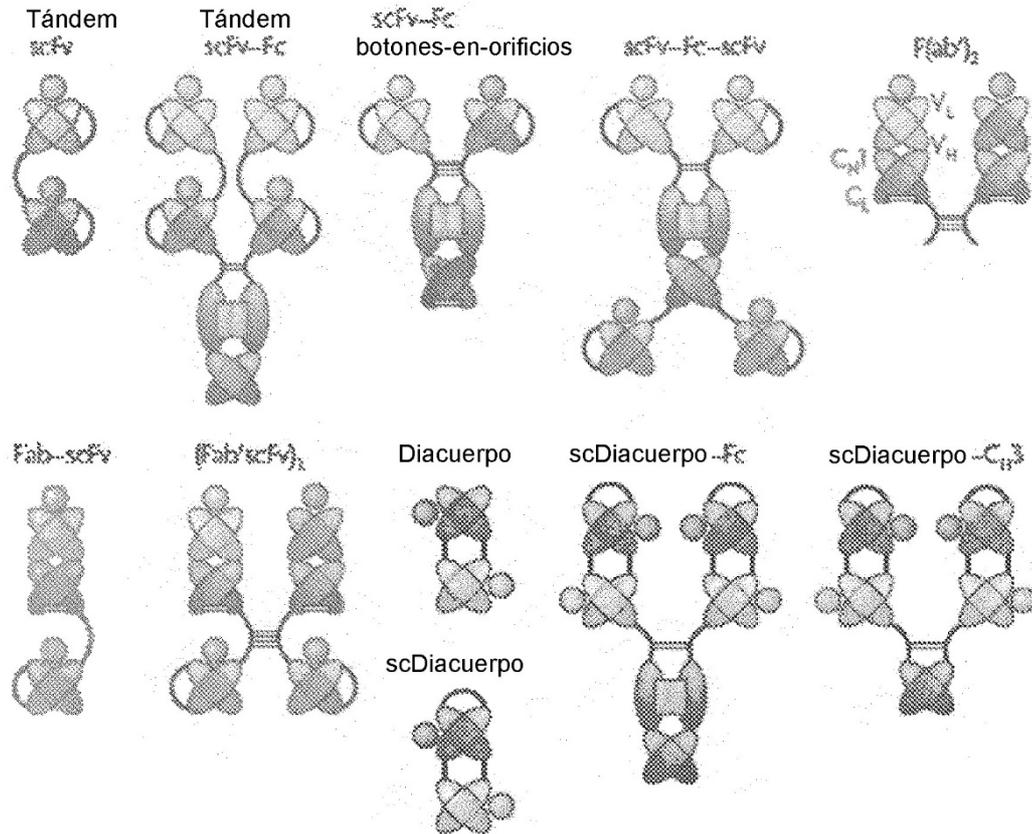


FIGURA 1, continuación

Anticuerpos biespecíficos a base de IgG

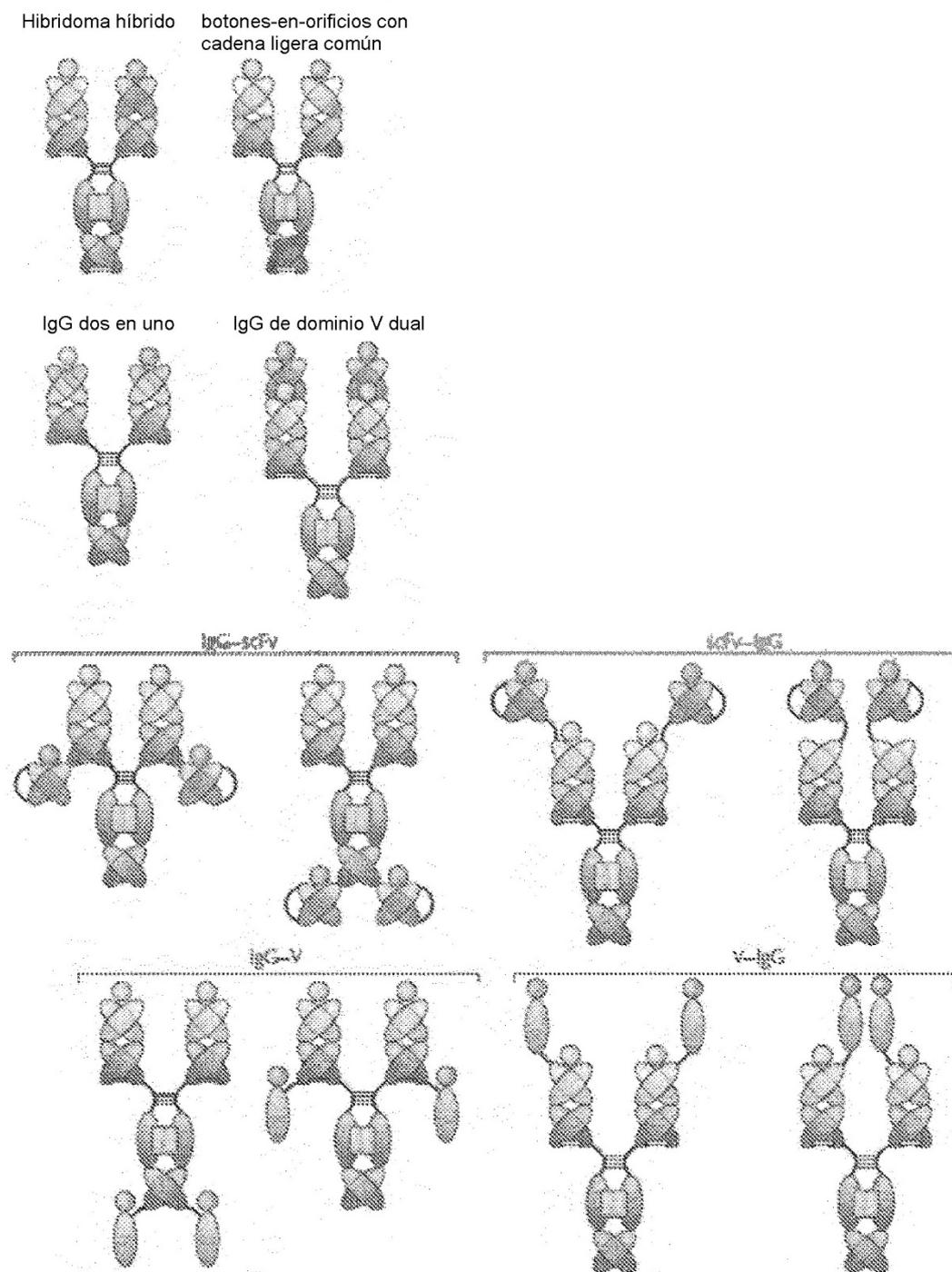


FIGURA 2

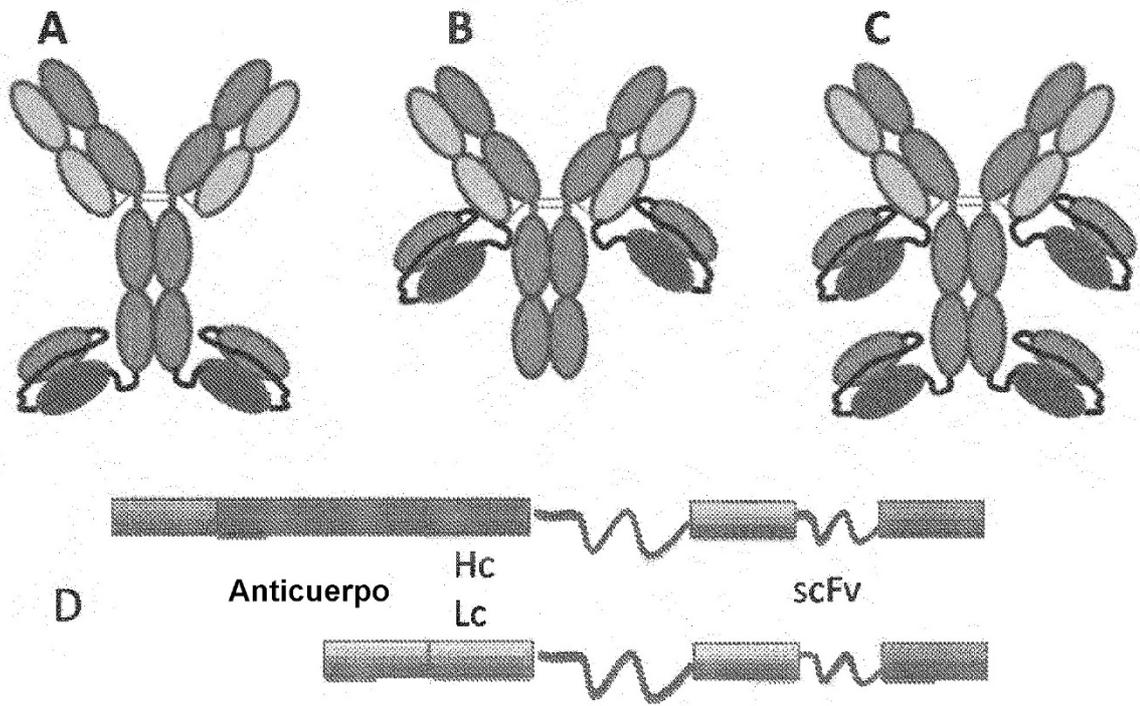


FIGURA 3A

Matrices de anticuerpos activables multispecificos:

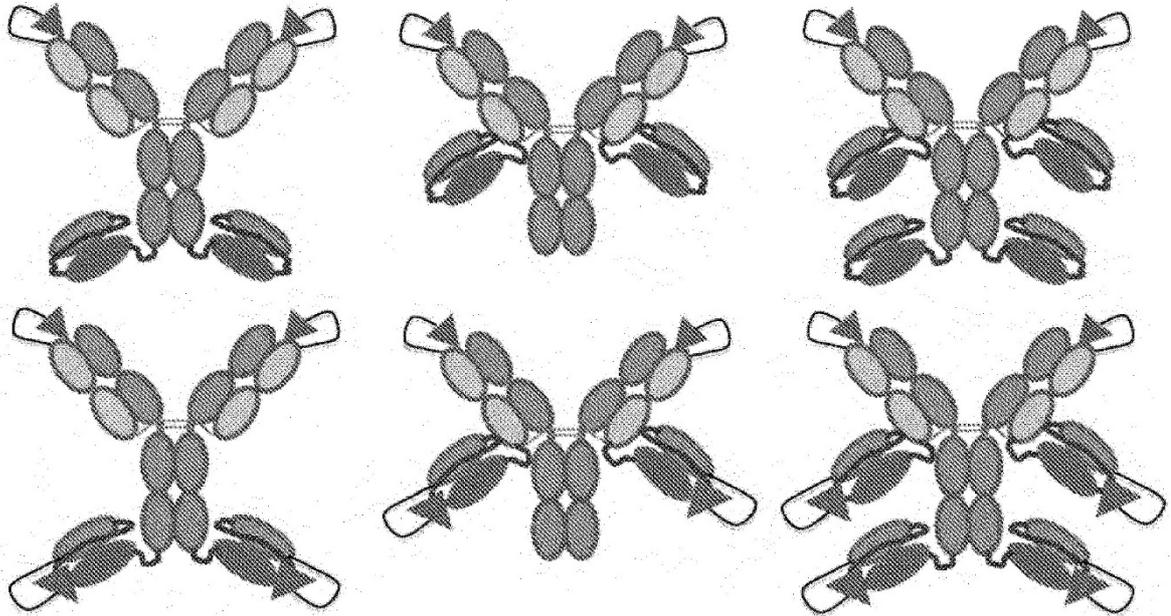


FIGURA 3B

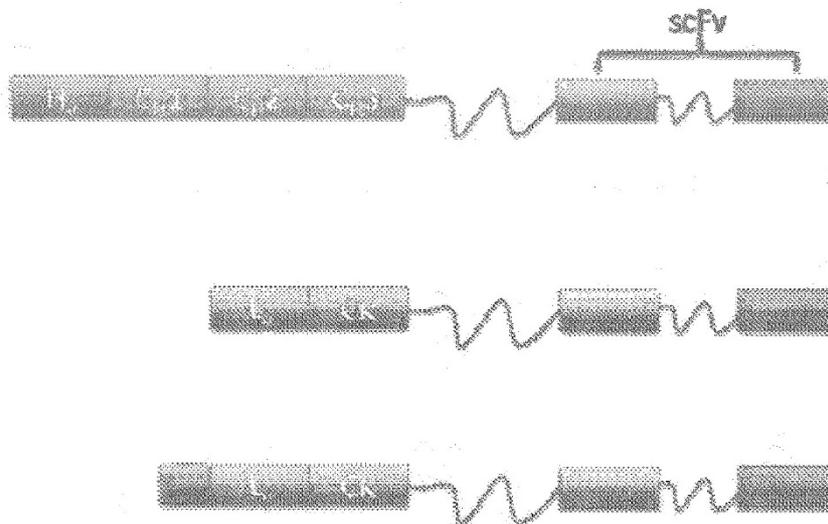


FIGURA 4

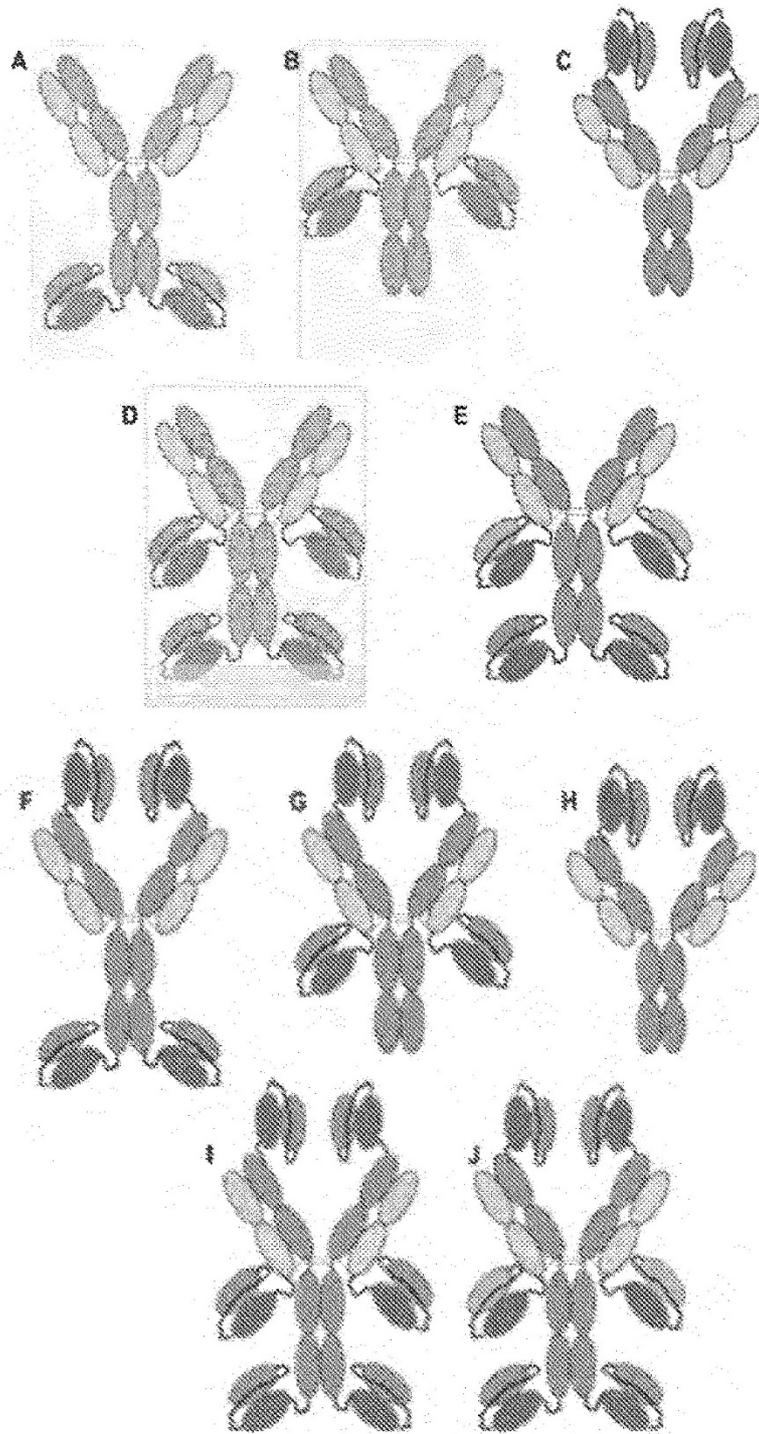


FIGURA 5

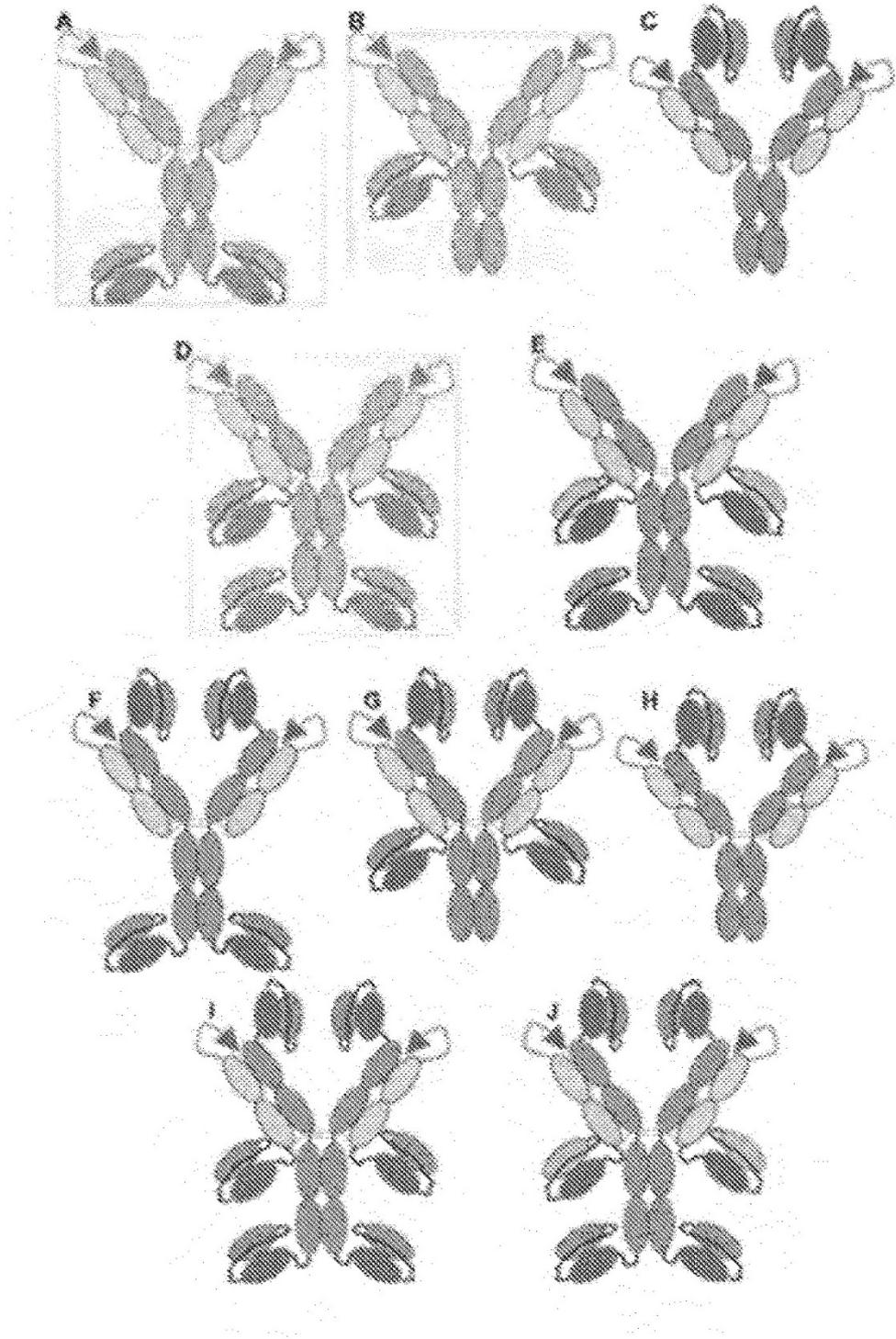


FIGURA 6

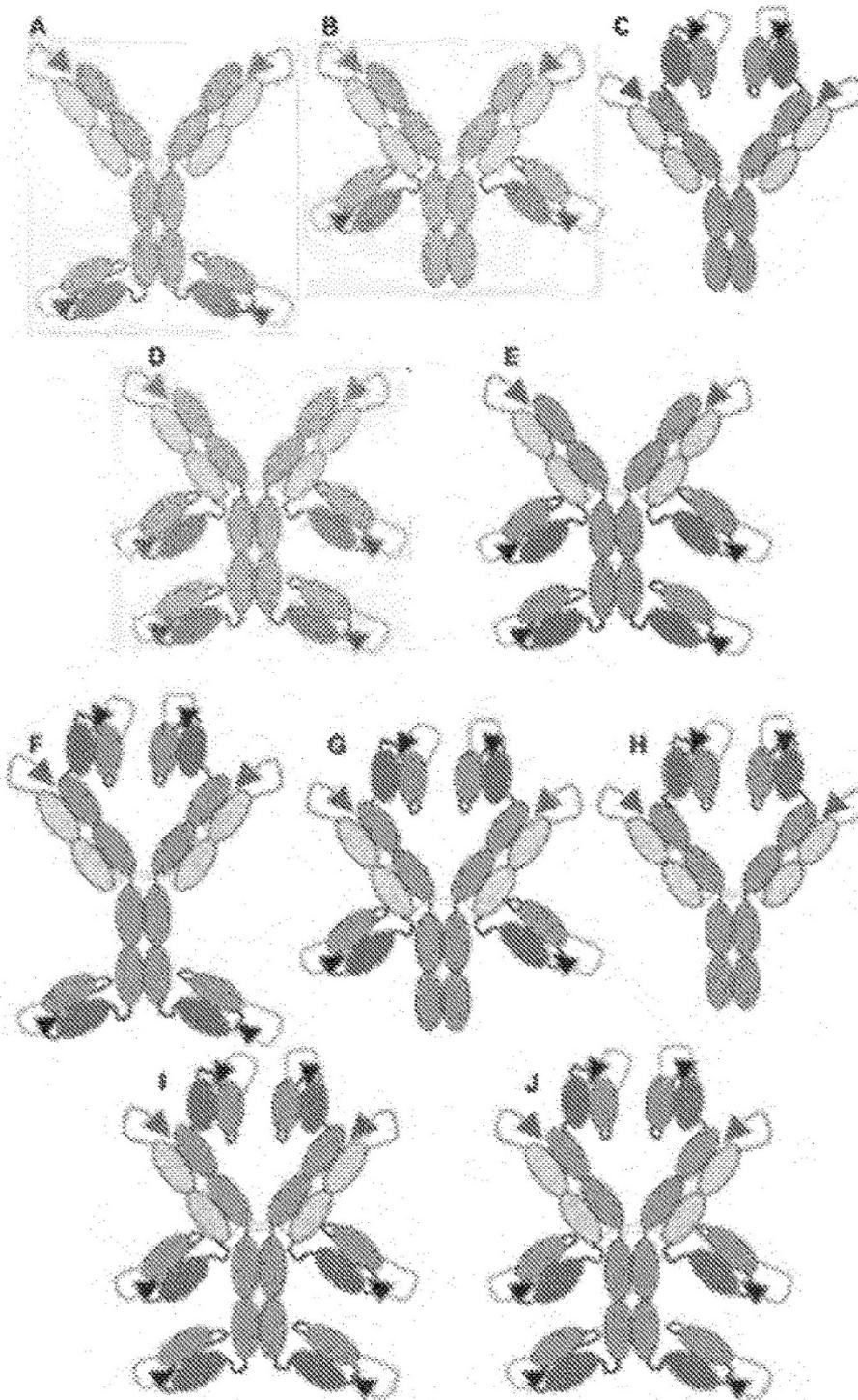


FIGURA 7

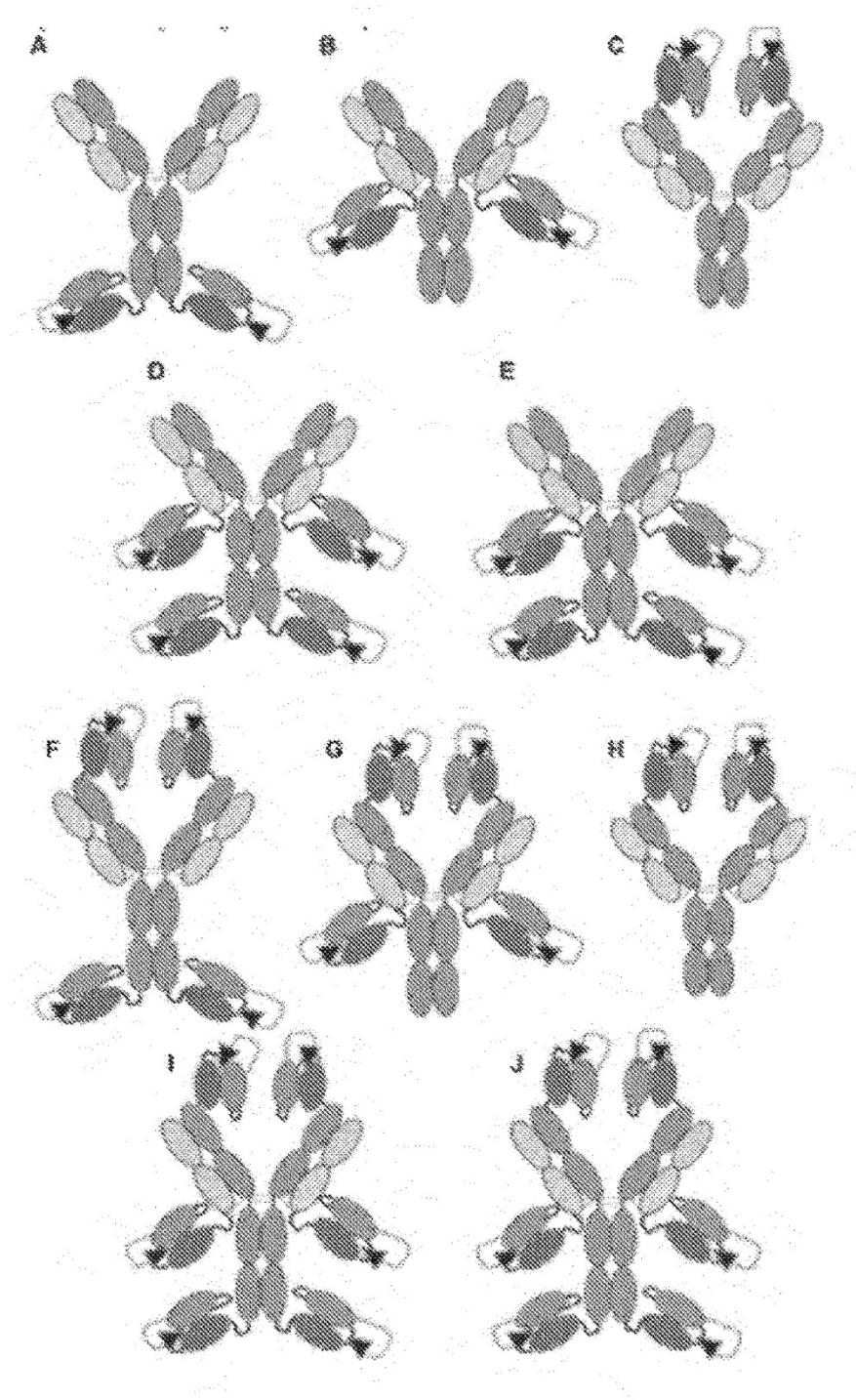


FIGURA 8

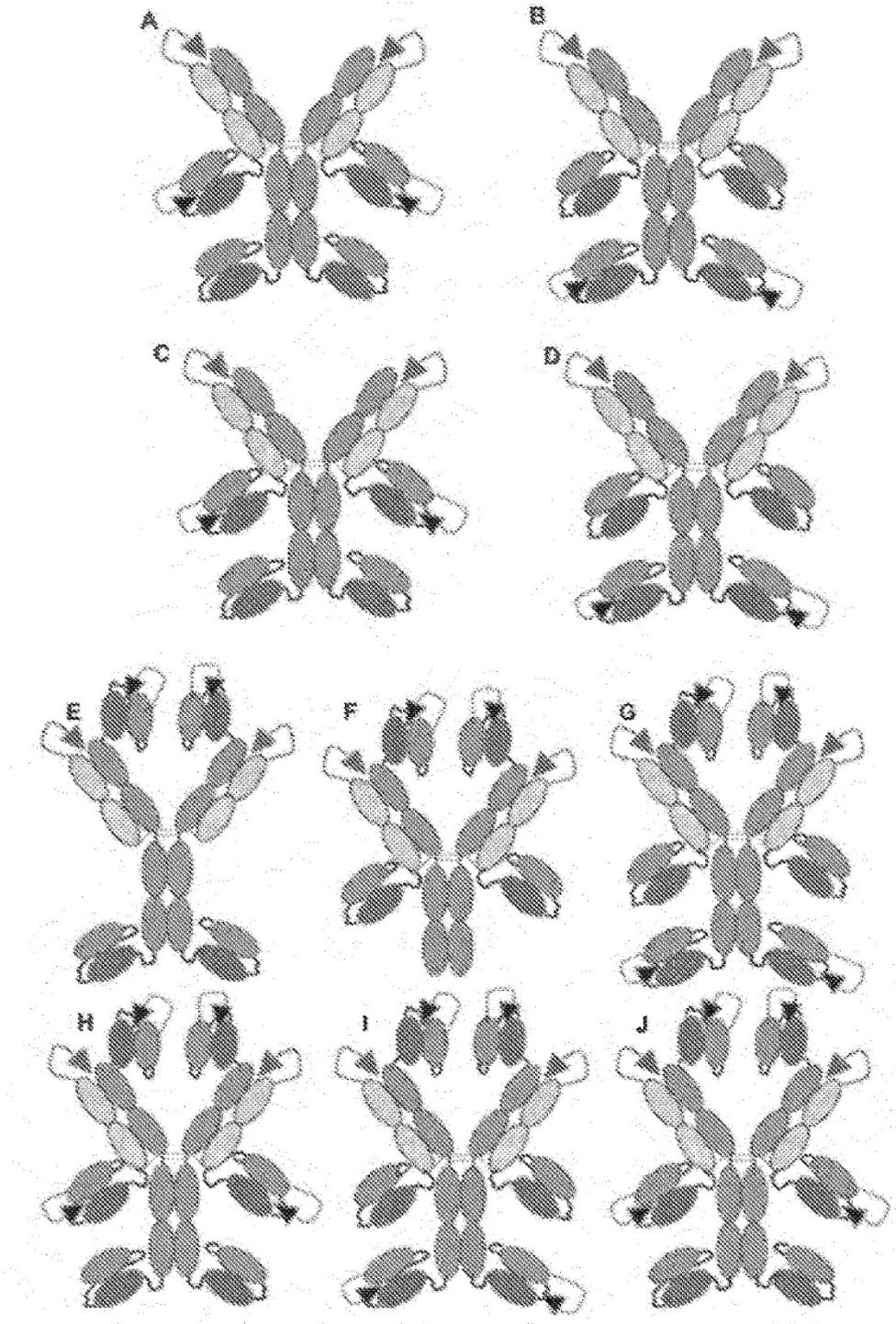


FIGURA 9

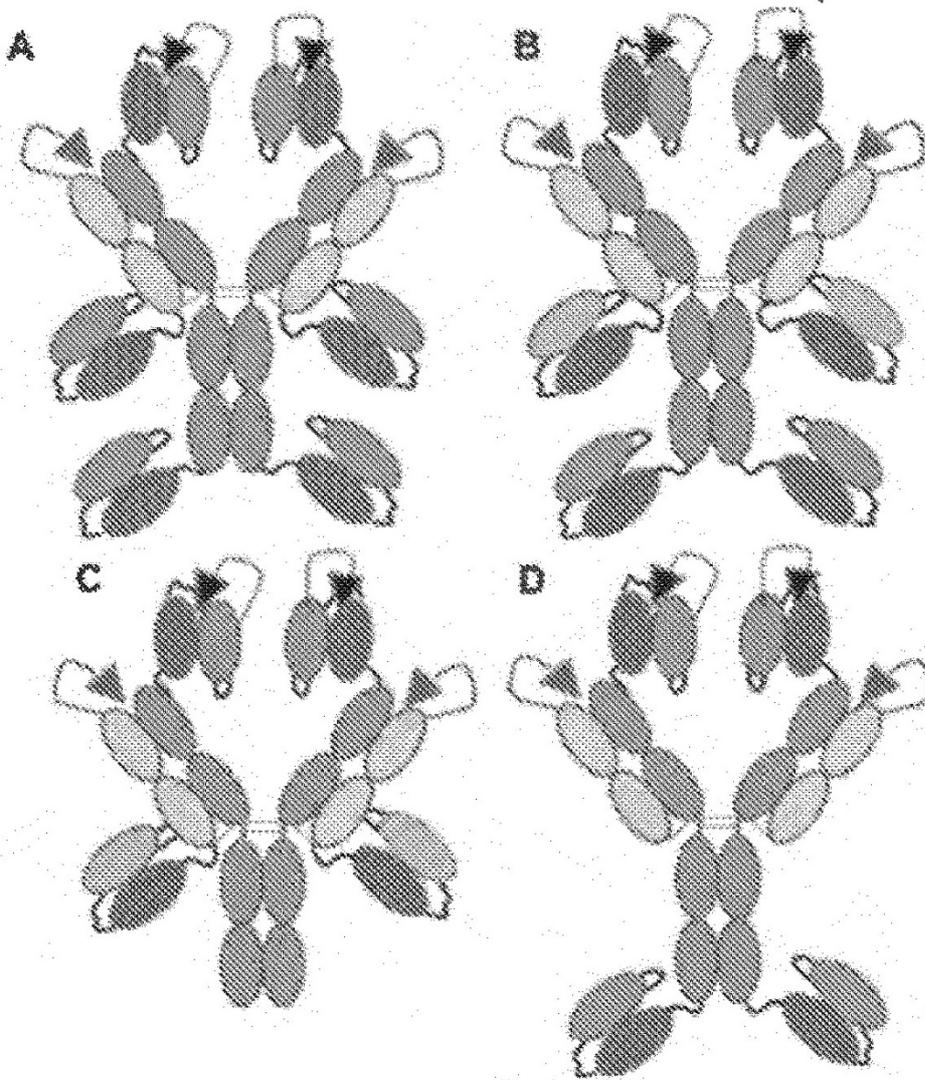
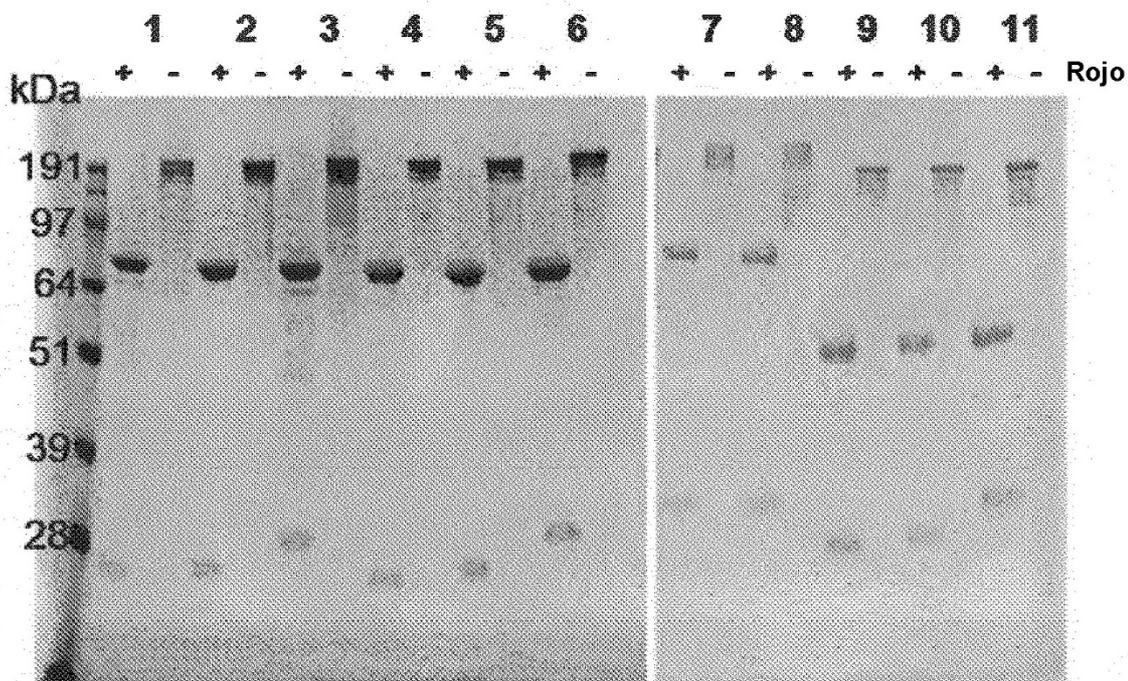


FIGURA 10



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

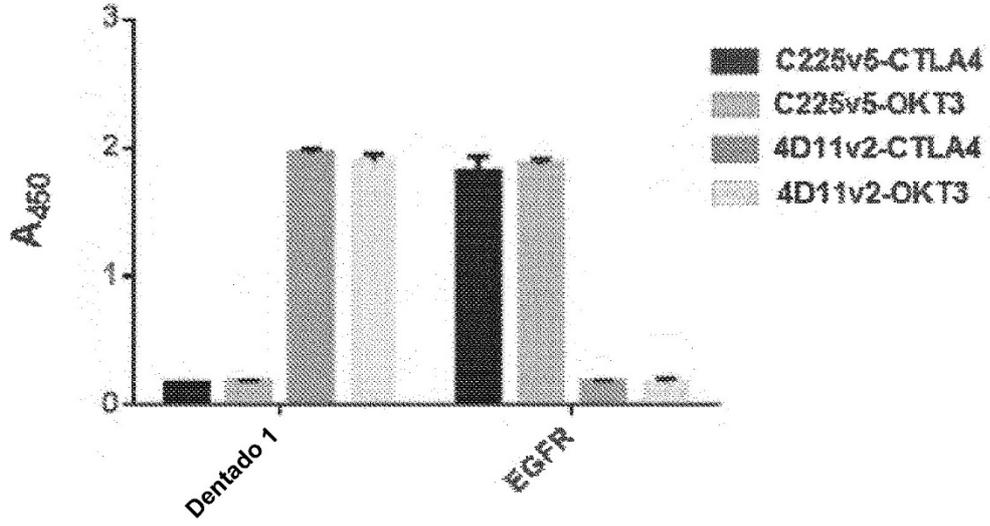


FIGURA 12A

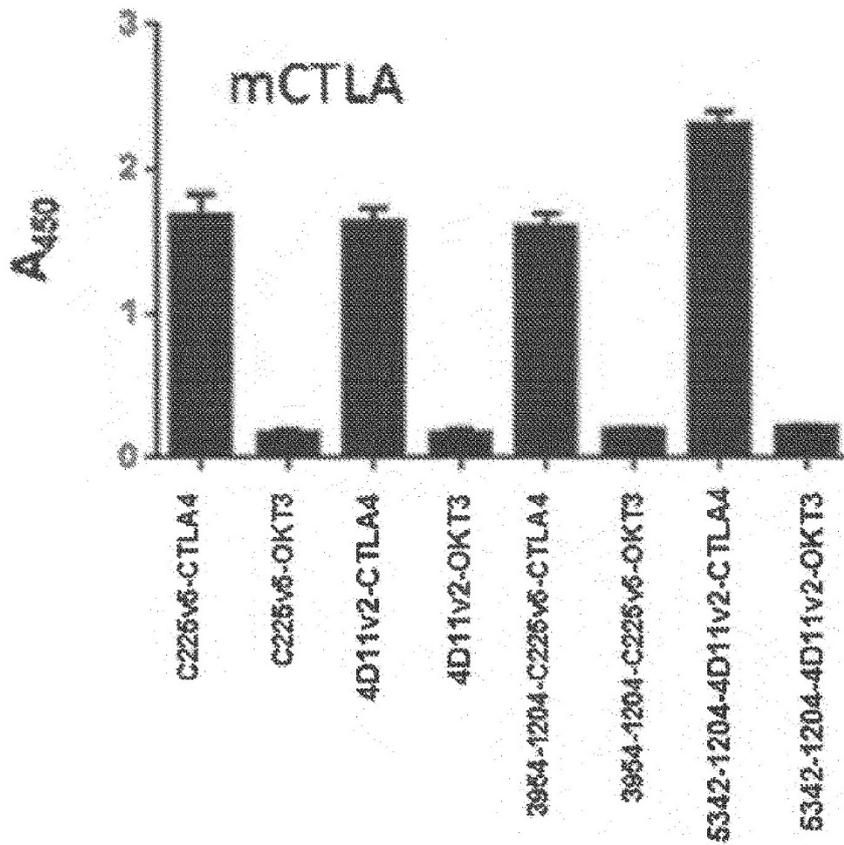


FIGURA 12B

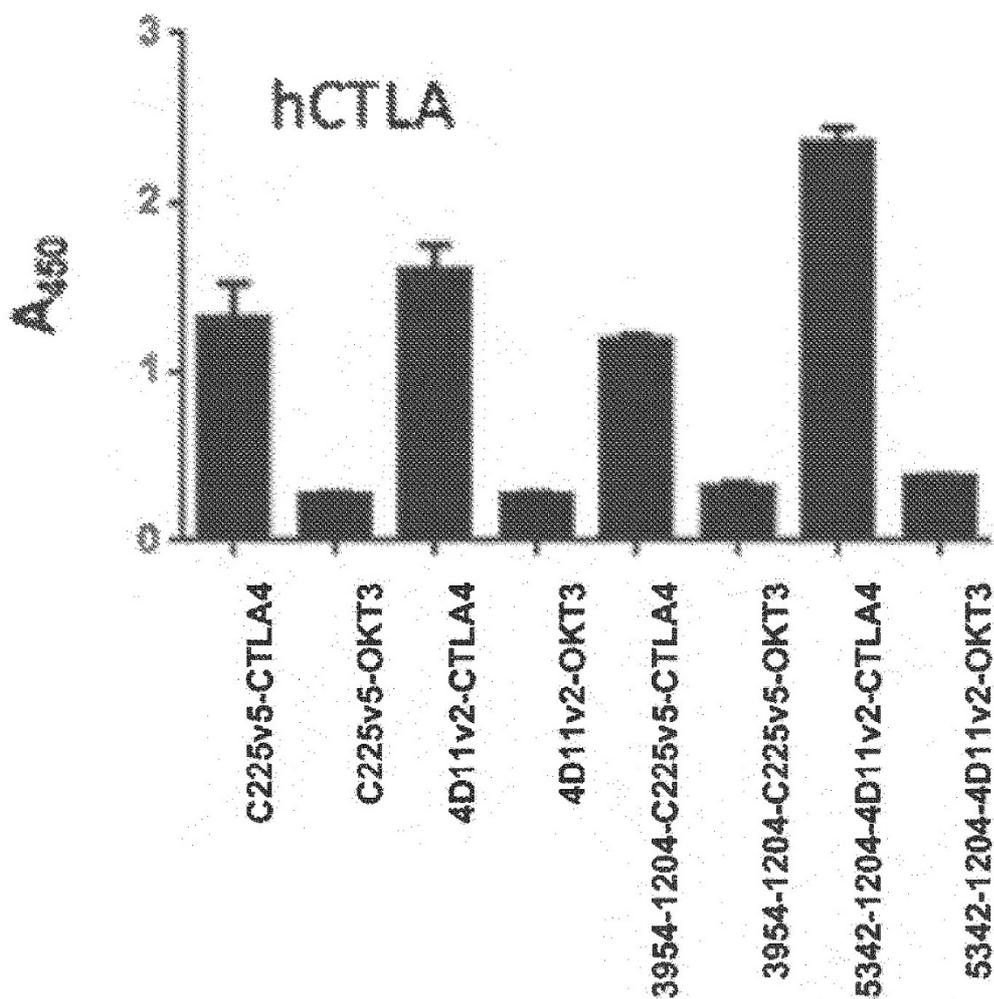


FIGURA 13

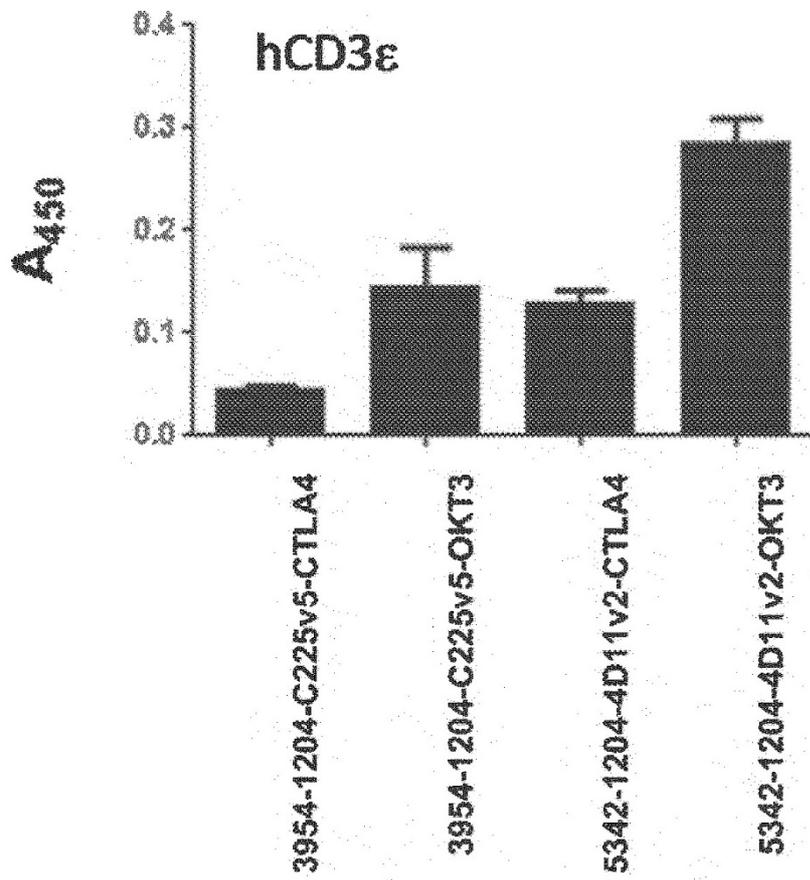


FIGURA 14

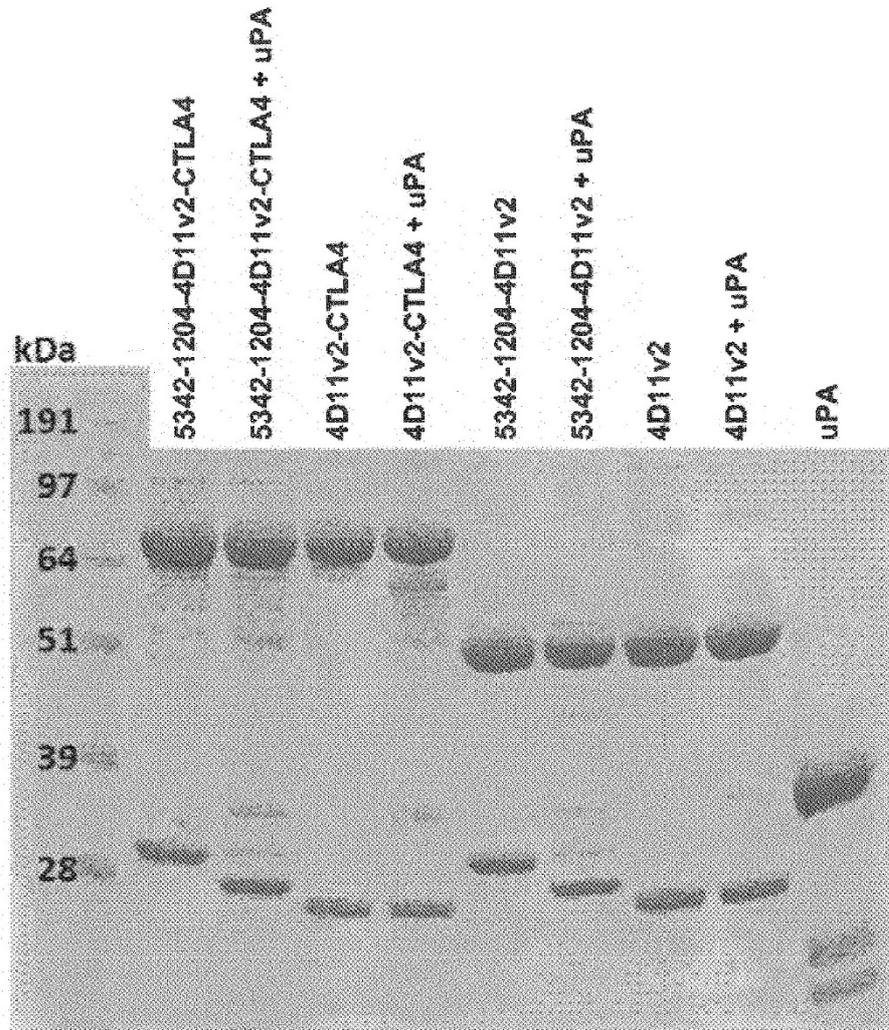


FIGURA 14, continuación

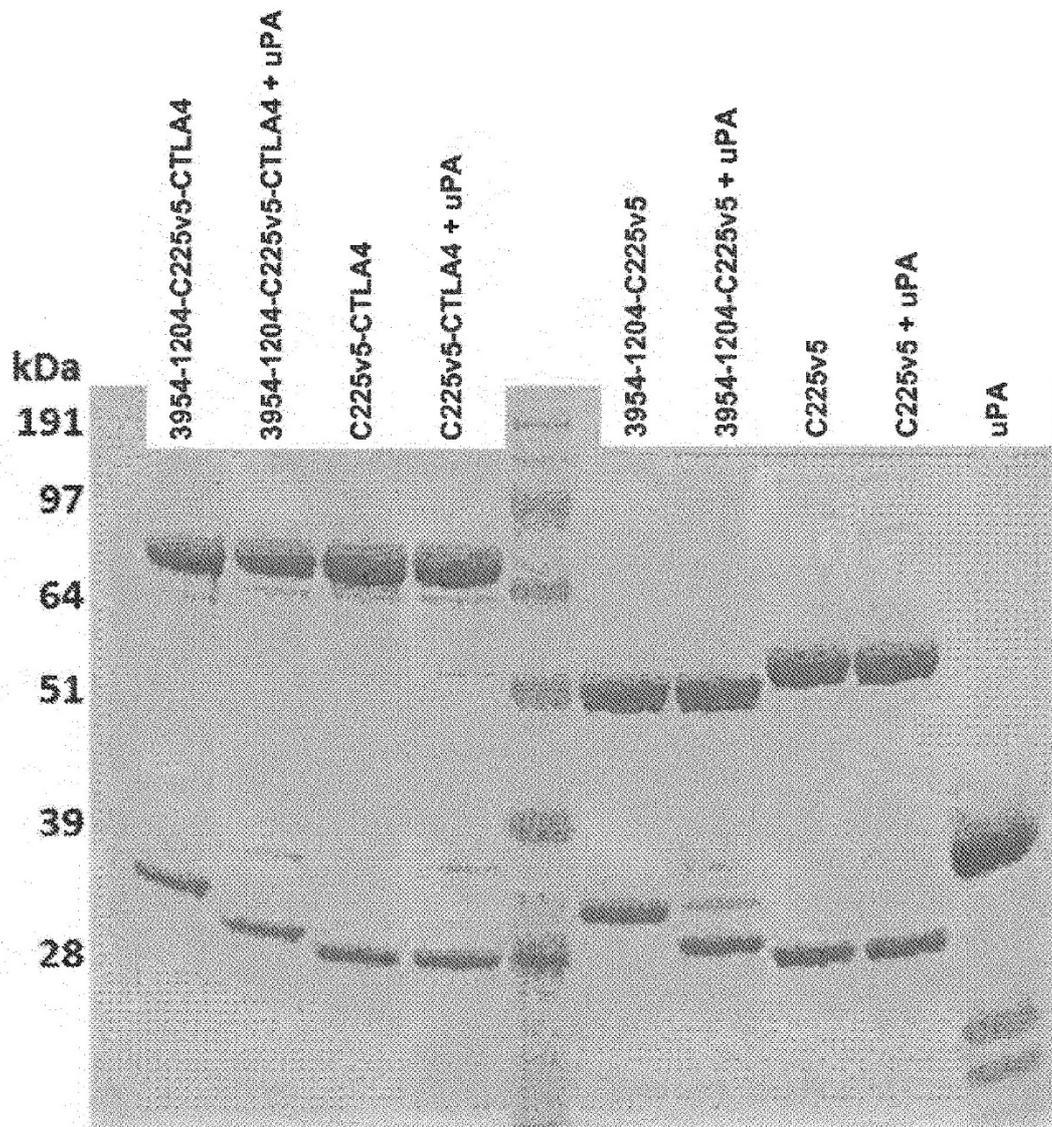


FIGURA 15A

Unión a EGFR

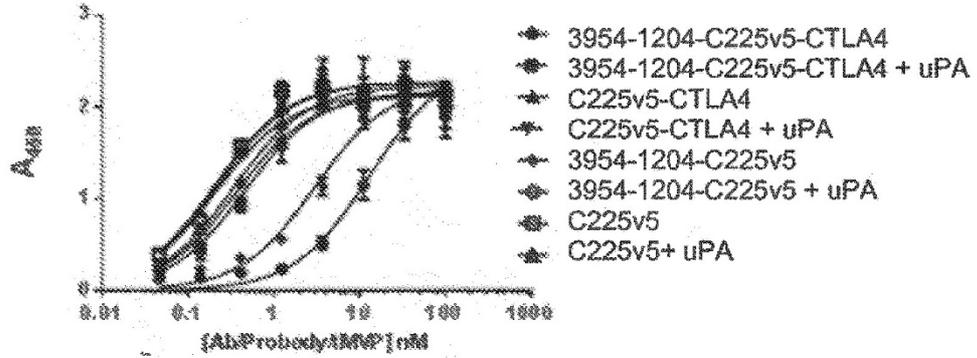


FIGURA 15B

Unión a CTLA4

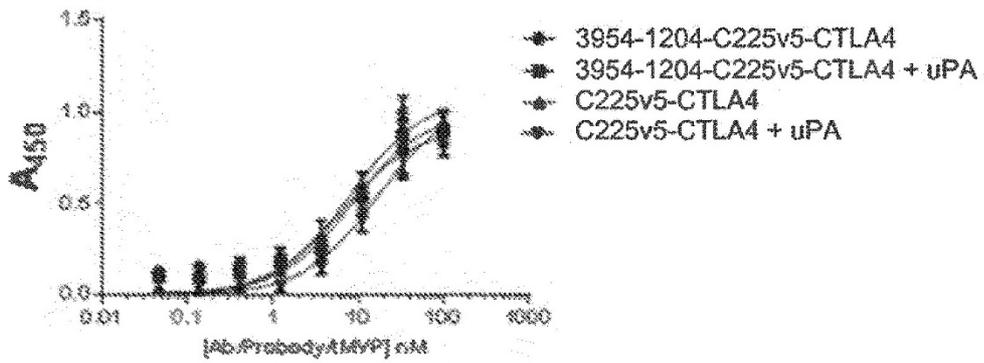


FIGURA 15C

Unión dentada

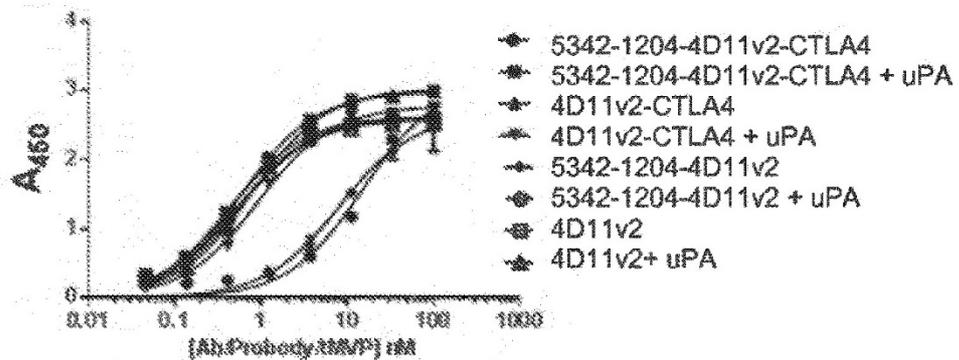


FIGURA 15D

Unión a CTLA4

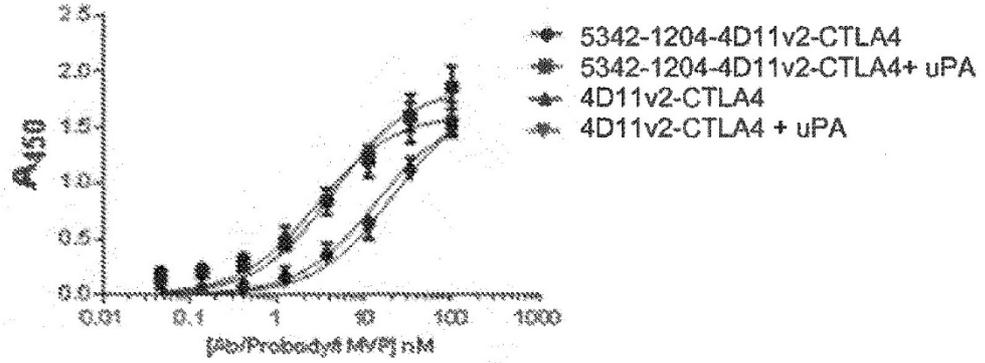


FIGURA 16A

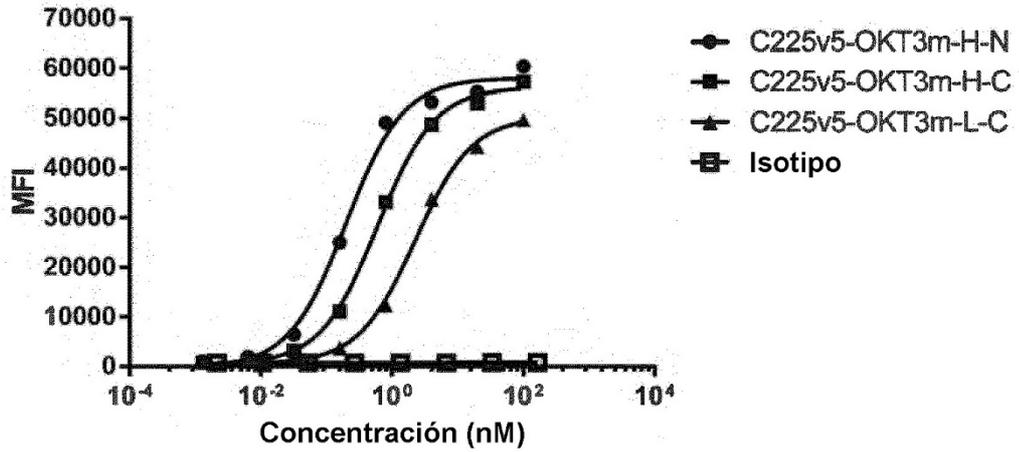


FIGURA 16B

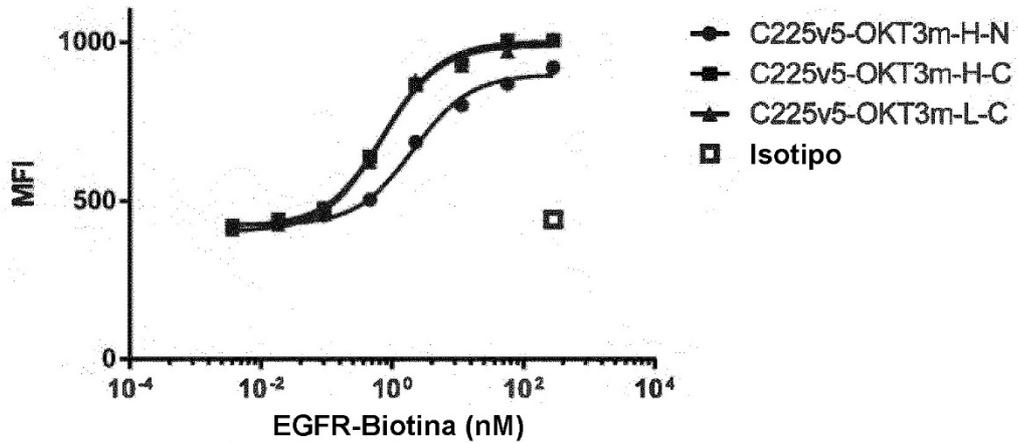


FIGURA 17

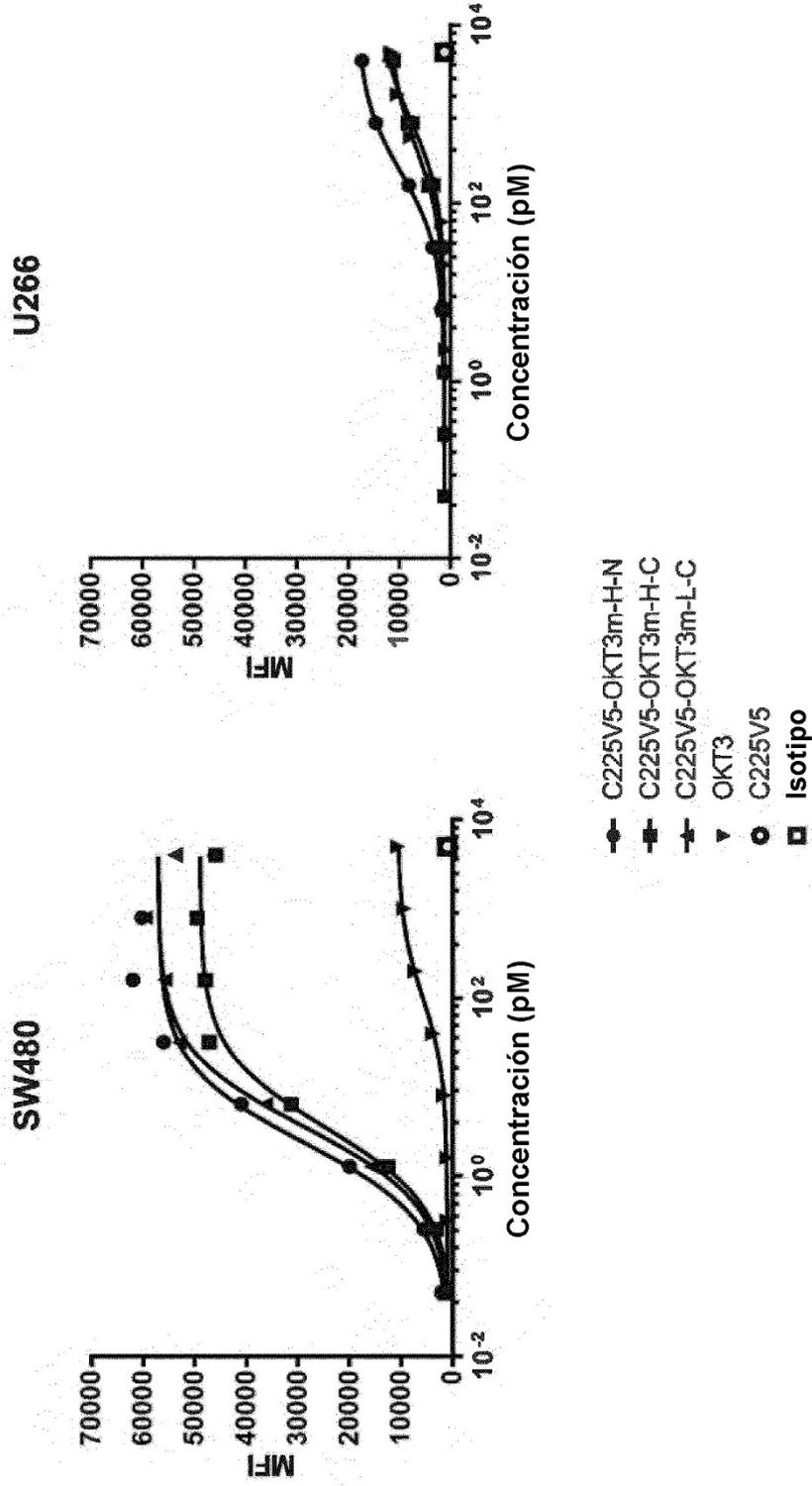


FIGURA 18A

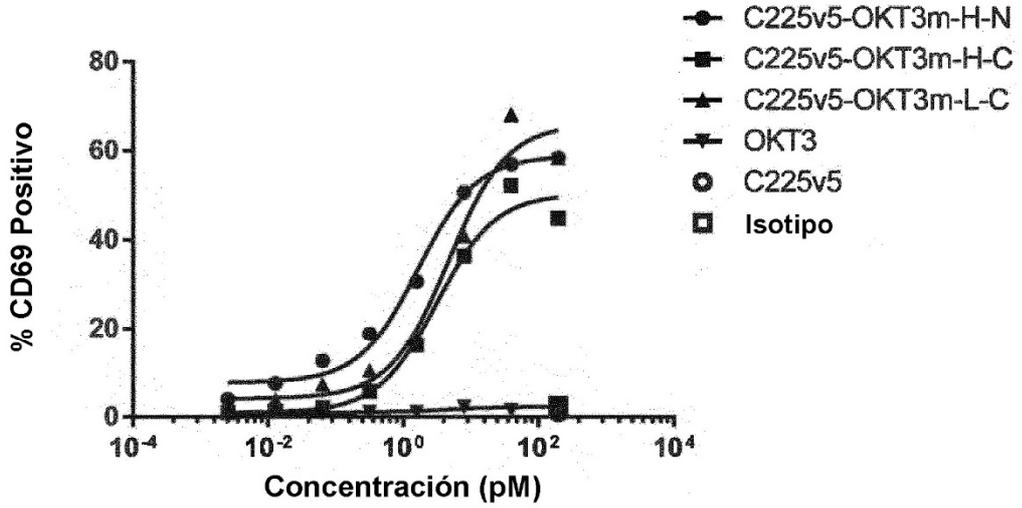


FIGURA 18B

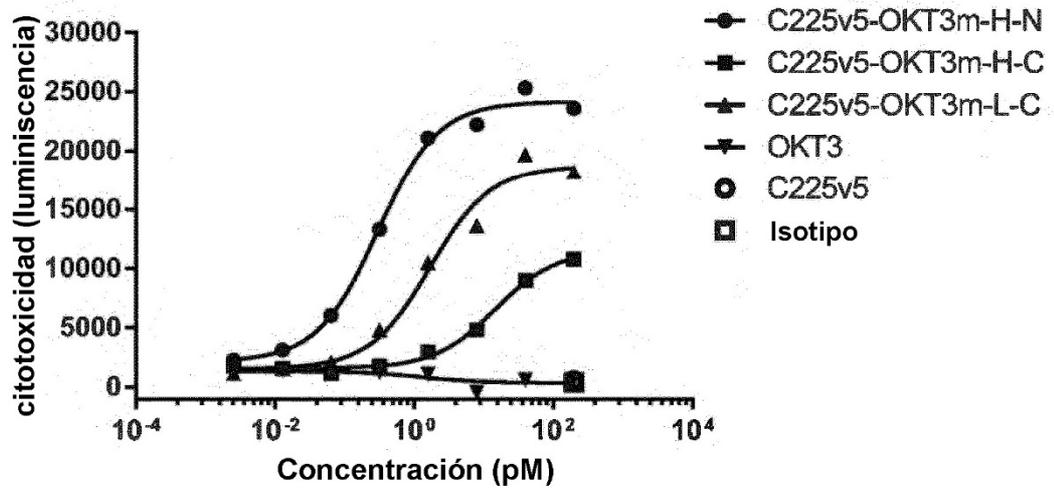


FIGURA 18C

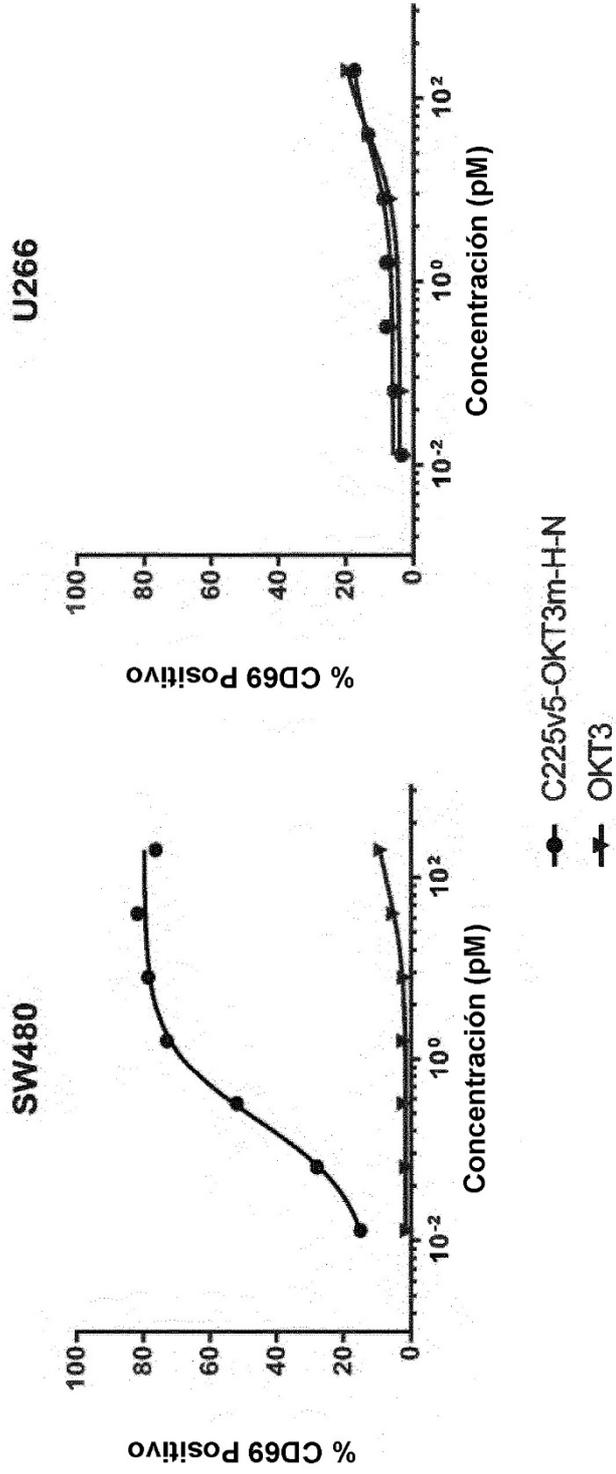
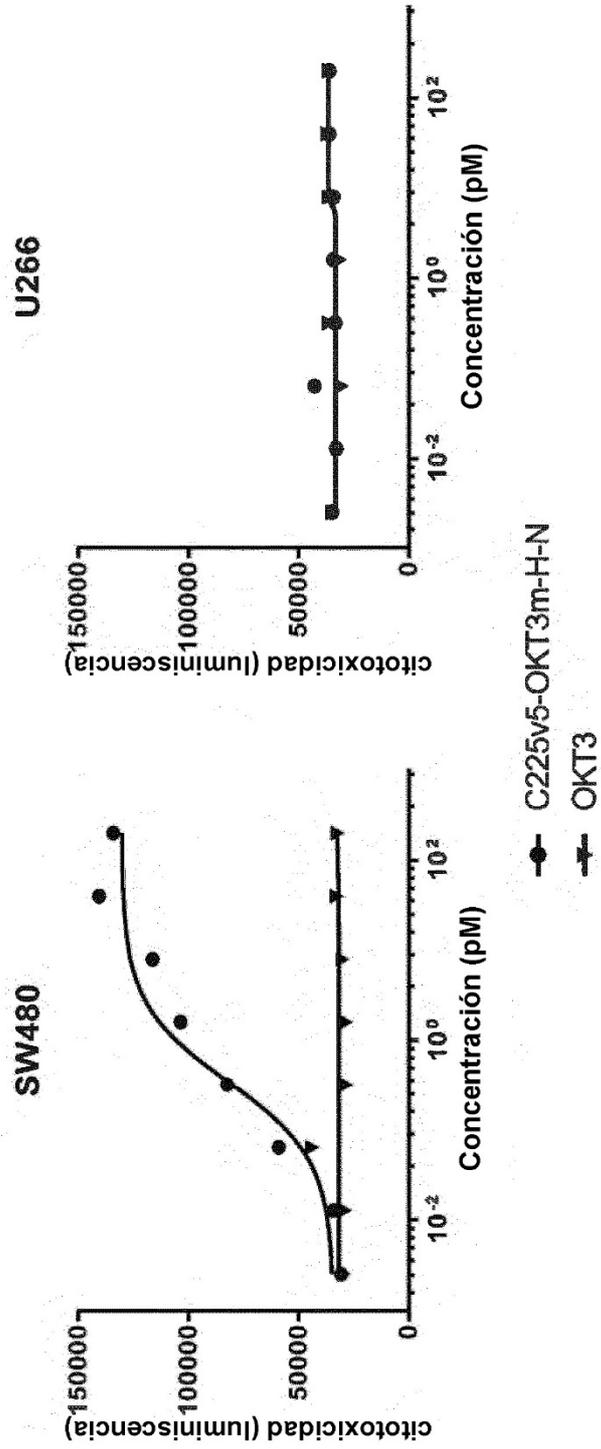


FIGURA 18D



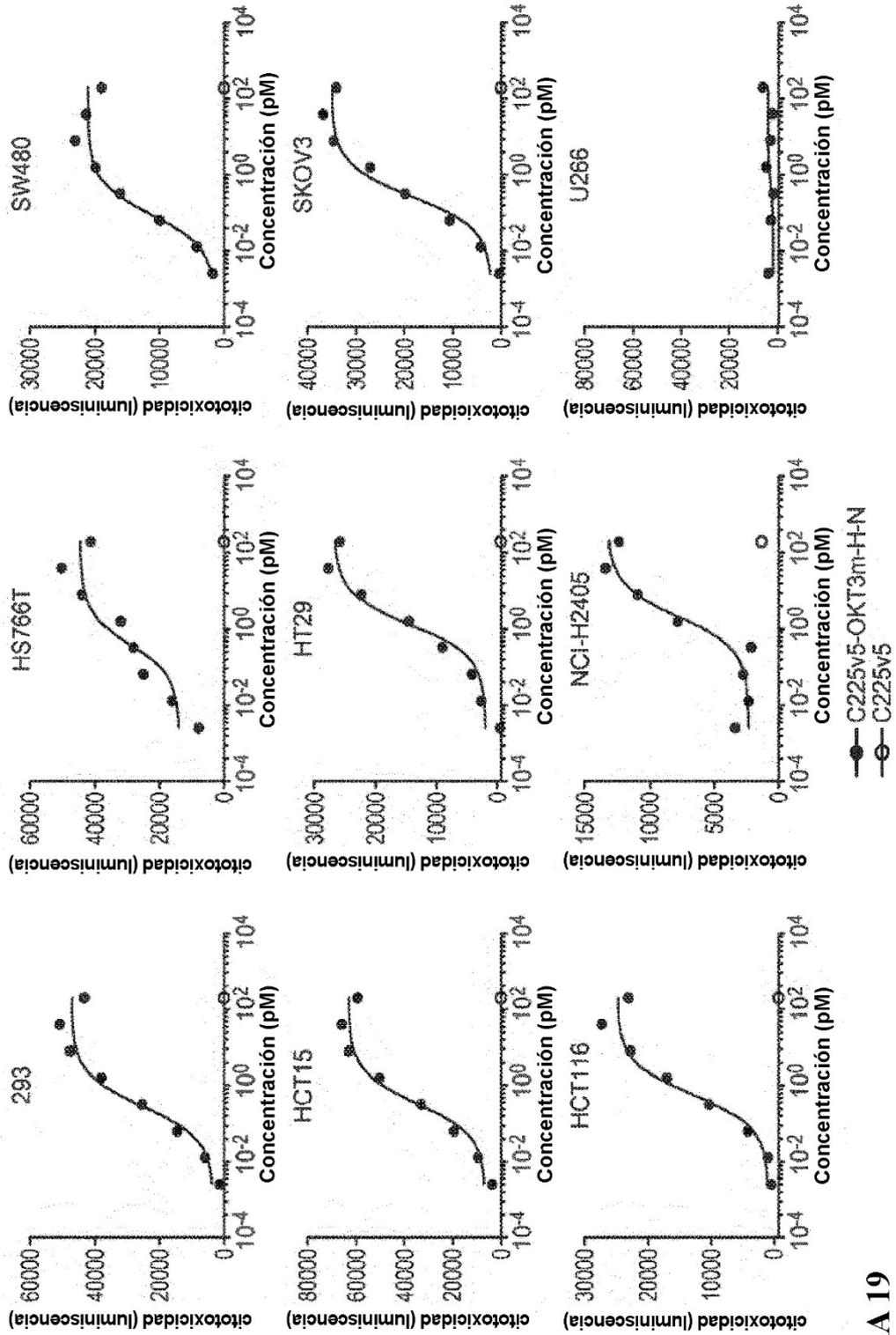


FIGURA 19

FIGURA 20A

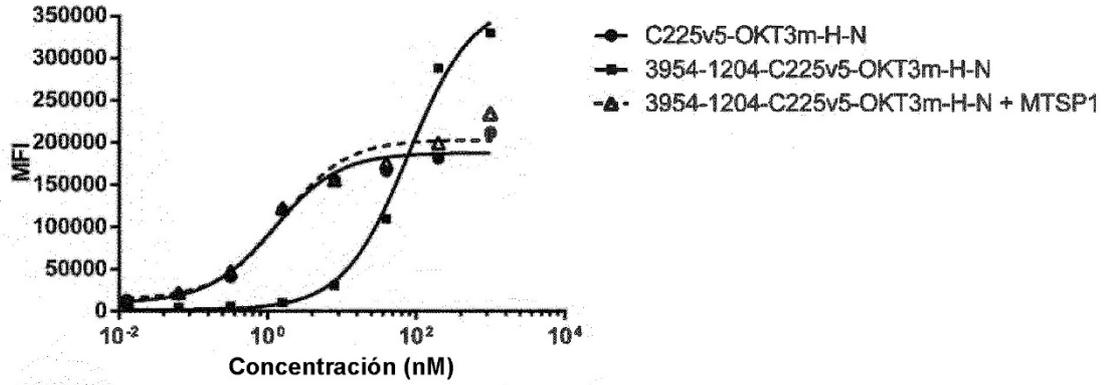


FIGURA 20B

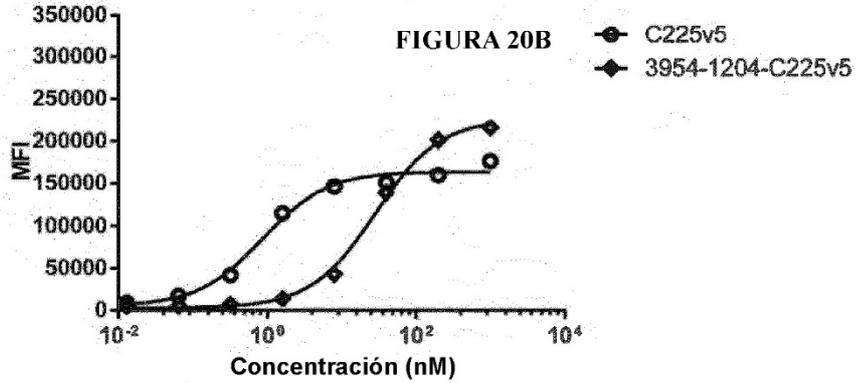


FIGURA 21A

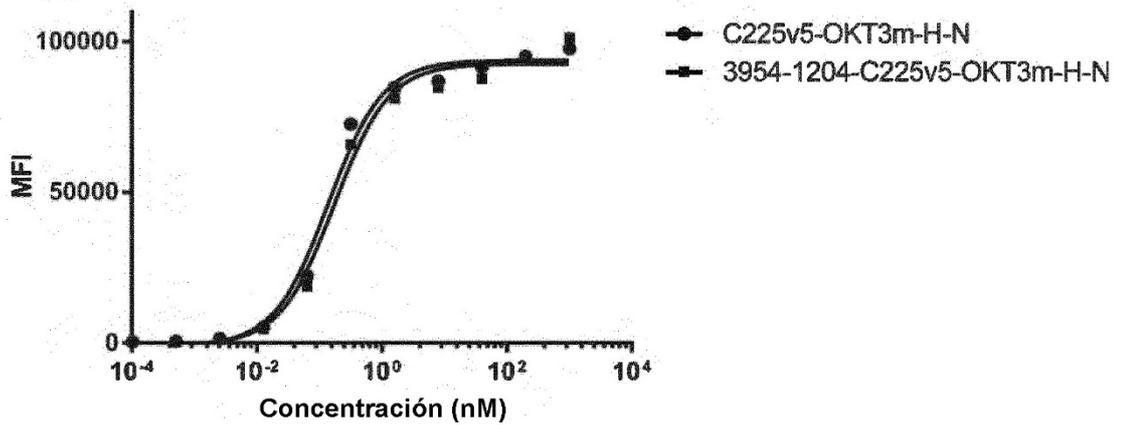


FIGURA 21B

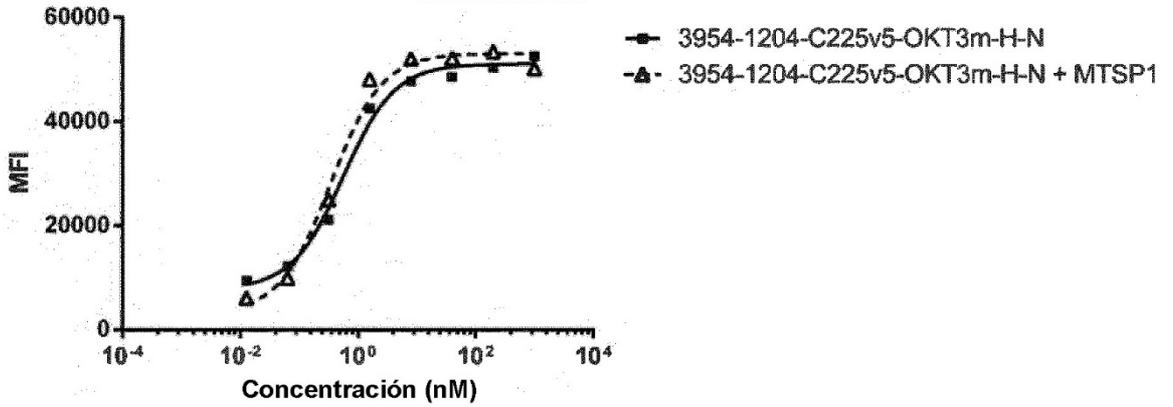


FIGURA 22

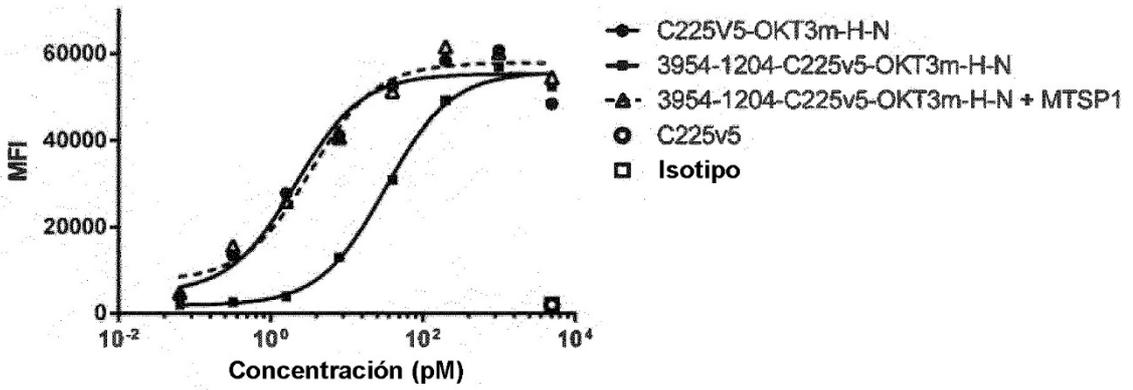


FIGURA 23A

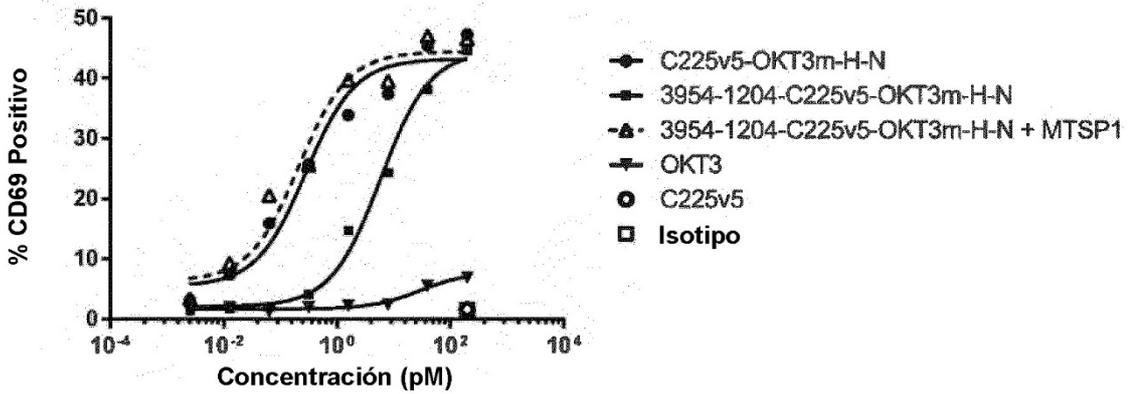


FIGURA 23B

