COMPOSICIONES DIRIGIDAS AL ANTÍGENO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DE PRÓSTATA (PSMA) Y MÉTODOS PARA ELABORAR Y UTILIZAR LAS MISMAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad para la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos con Núm. de Serie 63/444.839, presentada el 10 de febrero de 2023; y 63/499.031, presentada el 28 de abril de 2023; cuyo contenido se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

El cáncer de próstata es el segundo cáncer más común en los hombres y se espera que afecte a uno de cada nueve hombres en los Estados Unidos a lo largo de su vida. El tratamiento de la enfermedad localizada (medida por una puntuación de Gleason <6, PSA <10 ng/ml) mediante radiación, prostatectomía radical o vigilancia activa tiene éxito en el control de la enfermedad en estadio temprano; sin embargo, la recaída ocurre entre 20 y 50 % de los hombres. Los pacientes que continúan progresando con las terapias de privación de andrógenos (ADT) de primera y segunda línea desarrollan cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), que a menudo metastatiza (mCRPC) a hueso, cerebro, hígado y pulmones. Las quimioterapias tales docetaxel y cabazitaxel ha demostrado una mejor supervivencia en esta población, pero no existe cura para el mCRPC.

El Antígeno de Membrana Específico de Próstata (PSMA; también conocido como folato hidrolasa 1 y FOLH1) es una proteína integrante de la membrana de la superficie celular que con frecuencia se expresa en exceso en el cáncer de próstata y a menudo se asocia con el cáncer de próstata independiente de andrógenos y con lesiones metastásicas secundarias. El PSMA también se expresa dentro de la neovasculatura de los carcinomas de vejiga, riñón, gástrico y colorrectal.

Las inmunoterapias han demostrado un éxito mixto, incluso con respecto al cáncer de próstata. Si bien la primera inmunoterapia basada en células, sipuleucel T (PROVENGE®) se aprobó en 2010 para mCRPC, el bloqueo de puntos de control dirigido a los receptores inmunoinhibidores PD-1 y CTLA-4 ha demostrado muy poco en cuanto a la reducción de las tasas de respuesta en el cáncer de próstata en comparación con otras neoplasias malignas tumorales sólidas. Se ha sugerido que esto puede deberse al microambiente tumoral inmunológicamente “frío” de los tumores de cáncer de próstata primario, caracterizado por una baja infiltración de células inmunitarias y una carga débil de neoantígenos que se ha demostrado que es necesaria para la respuesta a los inhibidores del bloqueo de puntos de control.

Existe una necesidad sentida desde hace mucho tiempo y aún no satisfecha de una intervención terapéutica de los tumores que expresan PSMA, incluidos los tumores inmunológicamente fríos.

BREVE DESCRIPCIÓN

La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, moléculas de unión a antígeno con especificidad de unión a PSMA, moléculas de unión a antígeno con

especificidad de unión a CD3, así como moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen tanto a PSMA como a CD3 para su uso en entornos terapéuticos en los que se desea un direccionamiento específico y la destrucción mediada por células T de células que expresan PSMA. Los aspectos divulgados en el presente documento abordan una necesidad no satisfecha sentida desde hace mucho tiempo de terapias contra el cáncer dirigidas a PSMA, incluidos los acopladores de células T (TCE) que tienen un mayor índice terapéutico. Aspectos de la presente divulgación también abordan la necesidad sentida desde hace mucho tiempo y aún no satisfecha de la intervención terapéutica de tumores inmunológicamente fríos, p. ej., tumores sólidos, que expresan PSMA. También se incluyen, *p. ej.*, conectores escindibles por proteasa, fragmentos de códigos de barras, conectores de dominios de anticuerpo y TCE activables (incluidos aquellos que no se unen a PSMA). También se incluyen en el presente documento proteínas de fusión, tales como proteínas de fusión que no son TCE que se dirigen a PSMA, CD3 y/o que comprenden conectores y otros componentes proporcionados en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación incluyen compuestos, composiciones y métodos para aumentar la respuesta terapéutica de un sujeto a un inhibidor de punto de control (p. ej., un inhibidor de PD-1 o CTLA-4 tal como un anticuerpo anti-PD1 o un anticuerpo anti-CTLA4). En algunas modalidades, un compuesto proporcionado en el presente documento recluta y activa células T efectoras de una manera independiente del complejo principal de histocompatibilidad mediante el acoplamiento de CD3 sobre las células T. En algunas modalidades, el compuesto es un TCE biespecífico que se administra en forma inactiva y que se activa en y/o dentro del sitio del tumor. En algunas modalidades, se administra un TCE biespecífico antes de que comience una

terapia con inhibidores de puntos de control, al mismo tiempo que la terapia con inhibidores de puntos de control o después de que haya finalizado el inhibidor de puntos de control.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido quimérico que comprende un dominio de anticuerpo biespecífico, en donde el dominio de anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) y un segundo dominio de unión a antígeno que se une al receptor de células T del cúmulo de diferenciación 3 (CD3), en donde el primer dominio de unión a antígeno es un VHH; o el segundo dominio de unión a antígeno es un Fab o un scFV, y en donde el polipéptido quimérico comprende adicionalmente un polipéptido máscara unido al dominio de anticuerpo biespecífico a través de un conector que comprende un segmento de liberación escindible por proteasa situado entre el polipéptido máscara y el dominio de anticuerpo biespecífico de manera que el polipéptido máscara es capaz de reducir la unión del dominio de anticuerpo biespecífico a CD3 o PSMA, y en donde el segmento de liberación escindible por proteasa es escindible por al menos una proteasa que está presente en un tumor.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido quimérico que comprende un dominio de anticuerpo biespecífico, en donde el dominio de anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente al antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) y un segundo dominio de unión a antígeno que se une al receptor de células T del cúmulo de diferenciación 3 (CD3), en donde el polipéptido quimérico comprende adicionalmente un polipéptido máscara unido al dominio de anticuerpo biespecífico a través de un conector que comprende un segmento de liberación escindible por

proteasa situado entre el polipéptido máscara y el dominio de anticuerpo biespecífico de manera que el polipéptido máscara es capaz de reducir la unión del dominio de anticuerpo biespecífico a CD3 o PSMA, en donde el segmento de liberación escindible por proteasa no es susceptible de ser escindido por legumaína en plasma humano, o en donde la legumaína escinde el segmento de liberación escindible por proteasa en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 25 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una configuración estructural del lado N-terminal al lado C-terminal definida como: (primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(conector)-(polipéptido máscara), (segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(conector)-(polipéptido máscara), (polipéptido máscara)-(conector)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno), o (polipéptido máscara)-(conector)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno), en donde cada - es una conexión covalente o un conector polipeptídico.

En algunas modalidades, el polipéptido máscara es un ELNN.

En algunas modalidades, el conector comprende adicionalmente un espaciador.

En algunas modalidades, el segmento de liberación escindible por proteasa se fusiona al dominio de anticuerpo biespecífico a través del espaciador.

En algunas modalidades, el espaciador se caracteriza porque: (i) al menos 90 % de sus aminoácidos es glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E), prolina (P), o cualquier combinación de los mismos; y (ii) comprende al menos 3 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

En algunas modalidades, el espaciador tiene de 9 a 14 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, el espaciador comprende al menos 4 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P. En algunas modalidades, los aminoácidos del espaciador consisten en A, E, G, S, P, y/o T.

En algunas modalidades, el espaciador es escindible por una proteasa que no es de mamífero. En algunas modalidades, la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 % de identidad con una secuencia

enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C.

En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al

menos 94 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG.

En algunas modalidades, el segmento de liberación escindible por proteasa comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N. En algunas modalidades, X es S.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido quimérico que comprende un dominio de anticuerpo biespecífico, en donde el dominio de anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que tiene especificidad de unión a un antígeno de células cancerosas, y un segundo dominio de unión a antígeno que tiene especificidad de unión a un antígeno de células efectoras expresado sobre una célula efectora, en donde el polipéptido quimérico comprende adicionalmente un primer ELNN unido al primer dominio de unión a antígeno a través de un primer conector que comprende un primer segmento de

liberación (RS1) escindible por proteasa situado entre el primer ELNN y el primer dominio de unión a antígeno de manera que el primer ELNN es capaz de reducir la unión del primer dominio de unión a antígeno al antígeno de células cancerosas, en donde el RS1 es escindible por al menos una proteasa que está presente en un tumor, en donde el polipéptido quimérico comprende adicionalmente un segundo ELNN unido al segundo dominio de unión a antígeno a través de un segundo conector que comprende un segundo segmento de liberación (RS2) escindible por proteasa situado entre el segundo ELNN y el segundo dominio de unión a antígeno de manera que el segundo ELNN es capaz de reducir la unión del primer dominio de unión a antígeno al antígeno de células efectoras, en donde el RS2 es escindible por al menos una proteasa que está presente en un tumor, en donde el primer ELNN tiene una secuencia de aminoácidos más corta que el segundo ELNN, y en donde el antígeno de células cancerosas no es HER2.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una configuración estructural del lado N-terminal al lado C-terminal definida como: (ELNN1)-(Conector1)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Conector2)-(ELNN2), (ELNN1)-(Conector1)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Conector2)-(ELNN2), (ELNN2)-(Conector2)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Conector1)-(ELNN1), o (ELNN2)-(Conector2)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Conector1)-(ELNN1), en donde cada – es, individualmente, un enlace covalente o un conector polipeptídico.

En algunas modalidades, cada - es un enlace covalente. En algunas modalidades, cada - es un enlace peptídico.

En algunas modalidades, el Conector1 comprende adicionalmente un primer espaciador (Espaciador1). En algunas modalidades, el Conector2 comprende adicionalmente un segundo espaciador (Espaciador2).

En algunas modalidades, RS1 se fusiona al dominio de anticuerpo biespecífico a través del Espaciador1 y/o RS2 se fusiona al dominio de anticuerpo biespecífico a través del Espaciador2.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una configuración estructural del lado N-terminal al lado C-terminal definida como: (ELNN1)-(RS1)-(Espaciador1)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Espaciador2)-(RS2)-(ELNN2), (ELNN1)-(RS1)-(Espaciador1)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Espaciador2)-(RS2)-(ELNN2), (ELNN2)-(RS2)-(Espaciador2)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Espaciador1)-(RS1)-(ELNN1), o (ELNN2)-(RS2)-(Espaciador2)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Espaciador1)-(RS1)-(ELNN1), en donde cada - es, individualmente, un enlace covalente o un conector polipeptídico.

En algunas modalidades, cada - es un enlace covalente. En algunas modalidades, cada - es un enlace peptídico.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende adicionalmente un conector de dominios de anticuerpo entre el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido quimérico que comprende un dominio de anticuerpo biespecífico, que comprende las fórmulas que comprende del lado N-terminal al lado C-terminal: Formula 1: (Máscara1)-(RS1)-(Espaciador1)-(primer dominio de unión a antígeno)-[conector

de dominios de anticuerpo]-(segundo dominio de unión a antígeno); Formula 2: (primer dominio de unión a antígeno)-[conector de dominios de anticuerpo]-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Espaciador2)-(RS2)-(Mask2); o Formula 3: (Máscara1)-(RS1)-(Espaciador1)-(primer dominio de unión a antígeno)-[conector de dominios de anticuerpo]-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Espaciador2)-(RS2)-(Mask2), en donde, el primer dominio de unión a antígeno tiene especificidad de unión a un antígeno de células cancerosas; el segundo dominio de unión a antígeno tiene especificidad de unión a un antígeno de células efectoras expresado sobre una célula efectora; cada - comprende, individualmente, una conexión covalente o un conector polipeptídico; la Máscara1 es un polipéptido que es capaz de reducir la unión del primer dominio de unión a antígeno a su diana; la Máscara2 es un polipéptido que es capaz de reducir la unión del segundo dominio de unión a antígeno a su diana; si el polipéptido quimérico comprende la Fórmula 1, el Espaciador1 consiste en los residuos A, E, G, S, P, y/o T, si el polipéptido quimérico comprende la Fórmula 2, el Espaciador2 consiste en los residuos A, E, G, S, P, y/o T, y si el polipéptido quimérico comprende la Fórmula 3, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 consisten en los residuos A, E, G, S, P, y/o T; y en donde el antígeno de células cancerosas no es HER2.

En algunas modalidades, cada - es, individualmente, una conexión covalente. En algunas modalidades, cada - es, individualmente, un enlace covalente. En algunas modalidades, cada - es un enlace peptídico. En algunas modalidades, cada - es, individualmente, un conector polipeptídico de no más de 5 aminoácidos.

En algunas modalidades, el antígeno de células cancerosas es integrina alfa-4 humana, Ang2, B7-H3, B7-H6, CEACAM5, cMET, CTLA4, FOLR1, EpCAM, CCR5,

CD19, HER3, HER4, PD-L1, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), CEA, MUC1 (mucina), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16 βhCG, Lewis-Y, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM), CD133, ganglιósido GD3; 9-O-Acetil-GD3, GM2, Globo H, fucosil GM1, GD2, anhidrasa carbónica IX, CD44v6, Sonic Hedgehog (Shh), Wue-1, antígeno 1 de células plasmáticas, proteoglicano sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), CCR8, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata (STEAP), mesotelina, antígeno A33, antígeno de células madre prostáticas (PSCA), Ly-6, desmogleína 4, receptor de acetilcolina fetal (fnAChR), CD25, antígeno canceroso 19-9 (CA19-9), antígeno canceroso 125 (CA-125), receptor de la sustancia inhibidora Müelleriana tipo II (MISIIR), antígeno Tn sialilado (sTN), antígeno de activación de fibroblastos (FAP), endosialina (CD248), antígeno L6 asociado a tumores (TAL6), SAS, CD63, TAG72, antígeno de Thomsen-Friedenreich (antígeno TF), receptor I del factor de crecimiento similar a insulina (IGF-IR), antígeno Cora, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMPs, antígeno F19, CA19-9, CA-125, alfa-fetoproteína (AFP), VEGFR1, VEGFR2, DLK1, SP17, ROR1, o EphA2. En algunas modalidades, el antígeno de células cancerosas es PSMA.

En algunas modalidades, el antígeno de células efectoras es el cúmulo de diferenciación 3 de receptores de células T (CD3).

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno tiene especificidad de unión a CD3 humano y CD3 de mono cinomolgo.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno tiene especificidad de unión a CD3 humano.

En algunas modalidades, el antígeno de células efectoras es CD3 épsilon, CD3 delta, CD3 gamma, o CD3 zeta.

En algunas modalidades, el antígeno de células efectoras es CD3 épsilon.

En algunas modalidades, Máscara1 es un primer ELNN y la Máscara2 es un segundo ELNN.

En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 se caracterizan porque: (i) al menos 90 % de sus aminoácidos es glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E), prolina (P), o cualquier combinación de los mismos; y (ii) comprende al menos 3 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 tiene de 9 a 14 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden al menos 4 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

En algunas modalidades, los aminoácidos del Espaciador1 y/o el Espaciador2 consisten en A, E, G, S, P, y/o T.

En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 es escindible por una proteasa que no es de mamífero. En algunas modalidades, la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

El polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 42 a 47, en donde el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con

una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene 100 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla C.

En algunas modalidades, en donde el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %,

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En

algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG. En algunas modalidades, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene 100 % de identidad con GTSESATPES o GTATPESGPG.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos del primer ELNN es al menos 100 aminoácidos más corta que la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos del primer ELNN es al menos 200 aminoácidos más corta que la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos del primer ELNN es al menos 250 aminoácidos más corta que la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos del primer ELNN tiene aproximadamente 294 aminoácidos de longitud, y en donde la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN tiene aproximadamente 582 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión a antígeno comprende un primer anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y en donde el segundo dominio de unión a antígeno es un segundo anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión a antígeno es un Fab, un scFV, o un ISVD. En algunas modalidades, el ISVD es un dominio VHH. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno es un Fab, un scFV, o un ISVD. En algunas modalidades, el ISVD es un dominio VHH. En algunas

modalidades, el primer dominio de unión a antígeno es un dominio VHH. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno es un scFV.

En algunas modalidades, hay un conector de dominios de anticuerpo entre el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno.

En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de

anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla A o B.

En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo consiste en restos amino G y S. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo tiene aproximadamente 9 residuos de longitud. En algunas modalidades, el conector de dominios de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos GGGGSGGGS.

En algunas modalidades, el scFv comprende un dominio VL, un dominio VH, y un conector entre el dominio VL y el dominio VH, en donde el conector consiste en los residuos A, E, G, S, P, y/o T.

En algunas modalidades, el conector se caracteriza porque: (i) al menos 90 % de sus aminoácidos es glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E), prolina (P), o cualquier combinación de los mismos; y (ii) comprende al menos 3 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH tiene de 25 a 35 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende al menos 4 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

En algunas modalidades, los aminoácidos del conector entre el dominio VL y el dominio VH consiste en A, E, G, S, P, y/o T.

En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH es escindible por una proteasa que no es de mamífero. En algunas modalidades, la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81).

En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad con

SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81).

En algunas modalidades, el primer dominio de unión a antígeno comprende un dominio VHH que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de VHH, en donde las tres CDR de VHH comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de un dominio VHH que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VL que comprende las tres CDR de VL, en donde las tres CDR de VL comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de un dominio VL que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSX$_1$GAVTX$_2$SNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAX$_3$YYCALWYX$_4$NLWVFGGGTKLTV L, en donde X_1 corresponde a T o N, X_2 corresponde a T o S, X_3 corresponde a E o V, y X_4 corresponde a S o P.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VL que comprende las tres CDR de VL, en donde las tres CDR de VL comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de un dominio VL que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO: 361).

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VH que comprende las tres CDR de VH, en donde las tres CDR de VH

comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de un dominio VH que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: EVQLX$_5$ESGGGX$_6$VQPGGSLX$_7$LSCAASGFTFX$_8$TYAMNWVRQAPGKGLEWVX$_9$ RIRX$_{10}$KX$_{11}$NNYATYYADSVKX$_{12}$RFTISRDDSKNTX$_{13}$YLQMNX$_{14}$LKTEDTAVYYC VRHX$_{15}$NFGNSYVSWFAX$_{16}$WGQGTLVTVSS, en donde X$_5$ corresponde a V o L, X$_6$ corresponde a I o L, X$_7$ corresponde a R o K, X$_8$ corresponde a S o N, X$_9$ corresponde a G o A, X$_{10}$ corresponde a T o S, X$_{11}$ corresponde a R o Y, X$_{12}$ corresponde a G o D, X$_{13}$ corresponde a V o A, X$_{14}$ corresponde a S o N, X$_{15}$ corresponde a E o G, y X$_{16}$ corresponde a H o Y.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VH que comprende las tres CDR de VH, en donde las tres CDR de VH comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de un dominio VH que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311).

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende un par de secuencia de aminoácidos de dominio VL de SEQ ID NO/secuencia de aminoácidos de dominio VH de SEQ ID NO seleccionado del grupo que consiste en: 896/897; 902/903; 700/701; 702/703; 716/717; 718/719; 728/729; 736/737; 738/739; 740/741; 742/743; 744/745; 746/747; 748/749; 750/751; 752/753; 754/755; 756/757; 758/759; 760/761; 762/763; 764/765; 766/767; 774/775; 776/777; 790/791; 792/793; 798/799; 800/801; 806/807; 808/809; 814/815; 816/817; 822/823; 824/825; o 826/867.

En algunas modalidades, (i) el primer dominio de unión a antígeno es un VHH que comprende las siguientes CDR: una CDR1 de VHH con una secuencia de

aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG; una CDR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRKVSDSVKG; y una CDR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AASNKEYGRTWYDFNESDY, y (ii) en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende las siguientes CDR: un dominio VL CDR1 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RSSX$_1$GAVTX$_2$SNYAN, en donde X$_1$ corresponde a T o N, y X$_2$ corresponde a T o S; un dominio VL CDR2 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTNKRAP; un dominio VL CDR3 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ALWYX$_4$NLWV, en donde X$_4$ corresponde a S o P; un dominio VH CDR1 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GFTFX$_8$TYAMN, en donde X$_8$ corresponde a S o N; un dominio VH CDR2 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RIRX$_{10}$KX$_{11}$NNYATYYADSVKX$_{12}$, en donde X$_{10}$ corresponde a T o S, X$_{11}$ corresponde a R o Y, y X$_{12}$ corresponde a G o D; un dominio VH CDR3 con una

secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con $HX_{15}NFGNSYVSWFAX_{16}$, en donde X_{15} corresponde a E o G, y X_{16} corresponde a H o Y.

En algunas modalidades, (i) el primer dominio de unión a antígeno es un VHH que comprende las siguientes CDR: una CDR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG; una CDR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRKVSDSVKG; y una CDR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AASNKEYGRTWYDFNESDY, y (ii) en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende las siguientes CDR: un dominio VL CDR1 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RSSNGAVTSSNYAN; un dominio VL CDR2 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTNKRAP; un dominio VL CDR3 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ALWYPNLWV; un dominio VH CDR1 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GFTFSTYAMN; un dominio VH CDR2 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %,

94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RIRTKRNNYATYYADSVKG; y un dominio VH CDR3 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con HENFGNSYVSWFAH.

En algunas modalidades, el VHH comprende las siguientes regiones marco (FR): una FR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS; una FR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WFRQAPGKEREFVG; una FR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC; y una FR4 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTQVTVSS.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende las siguientes FR: una FR1 del dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC; una FR2 del dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVQQKPGQAPRGLIG; una FR3 del dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con

GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC; una FR4 del dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con FGGGTKLTVL; una FR1 del dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS; una FR2 del dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVRQAPGKGLEWVG; una FR3 del dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR; y una FR4 del dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTLVTVSS.

En algunas modalidades, (i) el primer dominio de unión a antígeno es un VHH que comprende las siguientes CDR: una CDR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG; una CDR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRK; y una CDR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad,

con AASNKEYGRTWYDFNESDY, y (ii) en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende las siguientes CDR: un dominio VL CDR1 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RSSX$_1$GAVTX$_2$SNYAN, en donde X$_1$ corresponde a T o N, y X$_2$ corresponde a T o S; un dominio VL CDR2 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTNKRAP; un dominio VL CDR3 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ALWYX$_4$NLWV, en donde X$_4$ corresponde a S o P; un dominio VH CDR1 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GFTFX$_8$TYAMN, en donde X$_8$ corresponde a S o N; un dominio VH CDR2 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RIRX$_{10}$KX$_{11}$NNYATYYADSVKX$_{12}$, en donde X$_{10}$ corresponde a T o S, X$_{11}$ corresponde a R o Y, y X$_{12}$ corresponde a G o D; un dominio VH CDR3 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con HX$_{15}$NFGNSYVSWFAX$_{16}$, en donde X$_{15}$ corresponde a E o G, y X$_{16}$ corresponde a H o Y.

En algunas modalidades, (i) el primer dominio de unión a antígeno es un VHH que comprende las siguientes CDR: una CDR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o

99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG; una CDR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRK; y una CDR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AASNKEYGRTWYDFNESDY, y (ii) en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende las siguientes CDR: un dominio VL CDR1 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RSSNGAVTSSNYAN; un dominio VL CDR2 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTNKRAP; un dominio VL CDR3 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ALWYPNLWV; un dominio VH CDR1 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GFTFSTYAMN; un dominio VH CDR2 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RIRTKRNNYATYYADSVKG; y un dominio VH CDR3 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con HENFGNSYVSWFAH.

En algunas modalidades, el VHH comprende las siguientes regiones marco (FR): una FR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o

100 % de identidad, con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS; una FR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WFRQAPGKEREFVG; una FR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con VSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC; y una FR4 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTQVTVSS.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende las siguientes FR: una FR1 del dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC; una FR2 del dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVQQKPGQAPRGLIG; una FR3 del dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC; una FR4 del dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con FGGGTKLTVL; una FR1 del dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con

EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS; una FR2 del dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVRQAPGKGLEWVG; una FR3 del dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR; y una FR4 del dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTLVTVSS.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSX_1GAVTX_2SNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAX_3YYCALWYX_4NLWVFGGGTKLTVL, en donde X_1 corresponde a T o N, X_2 corresponde a T o S, X_3 corresponde a E o V, y X_4 corresponde a S o P.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 361).

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: EVQLX$_5$ESGGGX$_6$VQPGGSLX$_7$LSCAASGFTFX$_8$TYAMNWVRQAPGKGLEWVX$_9$RIRX$_{10}$KX$_{11}$NNYATYYADSVKX$_{12}$RFTISRDDSKNTX$_{13}$YLQMNX$_{14}$LKTEDTAVYYCVRHX$_{15}$NFGNSYVSWFAX$_{16}$WGQGTLVTVSS, en donde X$_5$ corresponde a V o L, X$_6$ corresponde a I o L, X$_7$ corresponde a R o K, X$_8$ corresponde a S o N, X$_9$ corresponde a G o A, X$_{10}$ corresponde a T o S, X$_{11}$ corresponde a R o Y, X$_{12}$ corresponde a G o D, X$_{13}$ corresponde a V o A, X$_{14}$ corresponde a S o N, X$_{15}$ corresponde a E o G, y X$_{16}$ corresponde a H o Y.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311).

En algunas modalidades, el dominio VL es N-terminal con respecto al dominio VH. En algunas modalidades, el dominio VL es C-terminal con respecto al dominio VH.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende un scFV que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT

NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL
TVLSESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEVQLVESGGGIVQPGGSLRLS
CAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISR
DDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión a antígeno comprende un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de PSMA.2, PSMA.3, PSMA.5, PSMA.6, PSMA.262, o PSMA.263.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión a antígeno comprende un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVX$_{17}$GWFRQAPGKEREFVGAX$_{18}$SWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYX$_{19}$CX$_{20}$X$_{21}$SNKX$_{22}$YGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS, en donde X$_{17}$, X$_{18}$, X$_{19}$, X$_{20}$, X$_{21}$, y X$_6$ corresponden cada uno, individualmente, a cualquier aminoácido de origen natural. En algunas modalidades, X$_{17}$ corresponde a M o W, X$_{18}$ corresponde a M o I, X$_{19}$ corresponde a F o Y, X$_{20}$ corresponde a A o G, X$_{21}$ corresponde a A o G, y/o X$_{22}$ corresponde a L, W, R, D, E, o G.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión a antígeno comprende un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS

WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

En algunas modalidades, el RS comprende un sitio de escisión por proteasa que es escindible por al menos una proteasa enumerada en la Tabla 7.

En algunas modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas

modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a.

En algunas modalidades, el RS es escindible por uPA, ST14, MMP2, MMP7, MMP9, y MMP14.

En algunas modalidades, el RS no es escindible por legumaína. En algunas modalidades, el RS no es escindible por legumaína en sangre, plasma, o suero humanos. En algunas modalidades, el RS no es escindible después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas. En algunas modalidades, el RS no es escindible después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas en sangre, plasma, o suero humanos.

En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 50 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 25 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 10 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 5 % de la

velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 2,5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden un sitio de escisión por proteasa que es escindible por al menos una proteasa enumerada en la Tabla 7.

En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una

secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene 100 % de identidad con una secuencia enumerada en la Tabla 8a.

En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 son escindibles por uPA, ST14, MMP2, MMP7, MMP9, y MMP14.

En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 no son escindibles por legumaína. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 no son escindibles por legumaína en sangre, plasma, o suero humanos. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 no son escindibles después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas. En algunas modalidades, el RS1 y/o RS2 no son escindibles después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas en sangre, plasma, o suero humanos.

En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS1 y/o RS2 en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 50 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS1 y/o RS2 en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 25 % de la

velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS1 y/o RS2 en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 10 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS1 y/o RS2 en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS1 y/o RS2 en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 2,5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

En algunas modalidades, el RS1 comprende una secuencia de aminoácidos escindible por proteasa que comprende la secuencia: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N.

En algunas modalidades, el RS2 comprende una secuencia de aminoácidos escindible por proteasa que comprende la secuencia: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N.

En algunas modalidades, RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos escindible por proteasa que comprende la secuencia: EAGRSASHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7628).

En algunas modalidades, el RS1 y el RS2 son iguales. En algunas modalidades, el RS1 y el RS2 son diferentes.

En algunas modalidades, el polipéptido máscara es un primer polipéptido máscara y el segmento de liberación escindible por proteasa es un primer segmento de liberación (RS1) escindible por proteasa, y en donde el polipéptido quimérico

comprende adicionalmente un segundo polipéptido máscara y un segundo segmento de liberación (RS2) escindible por proteasa, en donde el segundo polipéptido máscara está unido al segundo dominio de unión a antígeno a través de un segundo segmento de liberación (RS2) escindible por proteasa situado entre el segundo polipéptido máscara y el segundo dominio de unión a antígeno de manera que el segundo polipéptido máscara reduce la unión del primer dominio de unión a antígeno a CD3, en donde el RS2 es escindible por al menos una proteasa que está presente en un tumor.

En algunas modalidades, el primer polipéptido máscara está anclado al primer dominio de unión a antígeno y en donde el segundo polipéptido máscara está anclado al segundo dominio de unión a antígeno.

En algunas modalidades, el primer polipéptido máscara es un primer ELNN y el segundo polipéptido máscara es un segundo ELNN.

En algunas modalidades, el primer ELNN y el segundo ELNN están caracterizados cada uno individualmente porque: (i) al menos 90 % de cada uno de los aminoácidos del primer ELNN y del segundo ELNN son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E), prolina (P), o cualquier combinación de los mismos; y (ii) cada uno comprende al menos 3 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

En algunas modalidades, el primer ELNN y el segundo ELNN están caracterizados cada uno individualmente de manera adicional porque: (i) cada uno comprende al menos 100 restos de aminoácidos; y (ii) cada uno comprende una pluralidad de motivos de secuencia no solapantes que tienen cada uno de 9 a 14 aminoácidos de longitud, en donde la pluralidad de motivos de secuencia no solapantes comprende un conjunto de motivos de secuencia no solapantes, en donde cada

motivo de secuencia no solapante del conjunto de motivos de secuencia no solapantes se repite al menos dos veces en el ELNN.

En algunas modalidades, la pluralidad de motivos de secuencia no solapantes comprende al menos un motivo de secuencia no solapante que aparece solamente una vez dentro del ELNN. En algunas modalidades, los motivos de secuencia no solapantes comprenden uno de, o cualquier combinación, de los motivos de secuencia enumerados en la Tabla 1. En algunas modalidades, los motivos de secuencia no solapantes comprenden al menos 2, 3, o 4 de los motivos de secuencia enumerados en la Tabla 1. En algunas modalidades, los motivos de secuencia no solapantes comprenden uno cualquiera de o cualquier combinación de GTSTEPSEGSAP, GTSESATPESGP, GSGPGTSESATP, GSEPATSGSETP, GSPAGSPTSTEE, y GTSPSATPESGP.

En algunas modalidades, cada uno del primer ELNN y el segundo ELNN comprende al menos 4 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P. En algunas modalidades, los aminoácidos de cada uno del primer ELNN y el segundo ELNN consiste en A, E, G, S, P, y/o T.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos del primer ELNN es al menos 100 aminoácidos más corta que la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos del primer ELNN es al menos 200 aminoácidos más corta que la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos del primer ELNN es al menos 250 aminoácidos más corta que la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos del primer ELNN tiene aproximadamente 294 aminoácidos de longitud, y en donde la

secuencia de aminoácidos del segundo ELNN tiene aproximadamente 582 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, el primer ELNN y/o el segundo ELNN comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 3a o 3b.

En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATP (SEQ ID NO: 8021). En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, de identidad con SEQ ID NO: 8021. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, de identidad con SEQ ID NO: 8021. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91 %, de identidad con SEQ ID NO: 8021. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 %, de identidad con SEQ ID NO: 8021. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 %, de identidad con SEQ ID NO: 8021. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 %, de identidad con SEQ ID NO: 8021. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de

aminoácidos que tiene al menos 95 %, de identidad con SEQ ID NO: 8021. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 %, de identidad con SEQ ID NO: 8021. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 %, de identidad con SEQ ID NO: 8021. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 %, de identidad con SEQ ID NO: 8021. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 %, de identidad con SEQ ID NO: 8021. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100 %, de identidad con SEQ ID NO: 8021.

En algunas modalidades, el segundo ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: ATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAGEPEA (SEQ ID NO: 8022). En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de

aminoácidos que tiene al menos 85 %, de identidad con SEQ ID NO: 8022. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, de identidad con SEQ ID NO: 8022. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91 %, de identidad con SEQ ID NO: 8022. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 %, de identidad con SEQ ID NO: 8022. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 %, de identidad con SEQ ID NO: 8022. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 %, de identidad con SEQ ID NO: 8022. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 %, de identidad con SEQ ID NO: 8022. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 %, de identidad con SEQ ID NO: 8022. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 %, de identidad con SEQ ID NO: 8022. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 %, de identidad con SEQ ID NO: 8022. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 %, de identidad con SEQ ID NO: 8022. En algunas modalidades, el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100 %, de identidad con SEQ ID NO: 8022.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende uno o más fragmentos de códigos de barras. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende dos o más fragmentos de códigos de barras. En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras es diferente de cualquier otro fragmento de código de barras.

En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras tiene una secuencia y peso molecular diferentes de todos los demás fragmentos que son liberables del polipéptido quimérico después de la digestión completa del polipéptido quimérico por una proteasa que no es de mamífero.

En algunas modalidades, la proteasa que no es de mamífero es Glu-C. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende un sitio de escisión por Glu-C que comprende una de las siguientes secuencias de aminoácidos: ATPESGPG, SGSETPGT, y GTSESATP.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SGPE.SGPGX_nSGPE.SGPG, SGPE.SGPGX_nATPE.SGPG, SGPE.SGPGX_nGTSE.SATP, SGPE.SGPGX_nTTPE.SGPG, SGPE.SGPGX_nSTPE.SGPG, SGPE.SGPGX_nGTPE.SGPG, SGPE.SGPGX_nGTPE.TPGS, SGPE.SGPGX_nGTPE.TPGS, SGPE.SGPGX_nSGSE.TGTP, SGPE.SGPGX_nGTPE.GSAP, SGPE.SGPGX_nEPSE.SATP, ATPE.SGPGX_nSGPE.SGPG, ATPE.SGPGX_nATPE.SGPG, ATPE.SGPGX_nGTSE.SATP, ATPE.SGPGX_nTTPE.SGPG, ATPE.SGPGX_nSTPE.SGPG, ATPE.SGPGX_nGTPE.SGPG, ATPE.SGPGX_nGTPE.TPGS, ATPE.SGPGX_nSGSE.TGTP, ATPE.SGPGX_nGTPE.GSAP, ATPE.SGPGX_nEPSE.SATP, GTSE.SATPX$_n$SGPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$ATPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$GTSE.SATP, GTSE.SATPX$_n$TTPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$STPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$GTPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$GTPE.TPGS, GTSE.SATPX$_n$SGSE.TGTP, GTSE.SATPX$_n$GTPE.GSAP, GTSE.SATPX$_n$EPSE.SATP,

TTPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG,

TTPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, TTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG,

TTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG,

TTPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, TTPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP,

TTPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, TTPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP,

STPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG,

STPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, STPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG,

STPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG,

STPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, STPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP,

STPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, STPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP,

GTPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG,

GTPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, GTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG,

GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG,

GTPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, GTPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP,

GTPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, GTPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP,

GTPE.TPGSX$_n$SGPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$ATPE.SGPG,

GTPE.TPGSX$_n$GTSE.SATP, GTPE.TPGSX$_n$TTPE.SGPG,

GTPE.TPGSX$_n$STPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$GTPE.SGPG,

GTPE.TPGSX$_n$GTPE.TPGS, GTPE.TPGSX$_n$SGSE.TGTP,

GTPE.TPGSX$_n$GTPE.GSAP, GTPE.TPGSX$_n$EPSE.SATP,

SGSE.TGTPX$_n$SGPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$ATPE.SGPG,

SGSE.TGTPX$_n$GTSE.SATP, SGSE.TGTPX$_n$TTPE.SGPG,

SGSE.TGTPX$_n$STPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$GTPE.SGPG,

SGSE.TGTPX$_n$GTPE.TPGS, SGSE.TGTPX$_n$SGSE.TGTP,

SGSE.TGTPX$_n$GTPE.GSAP, SGSE.TGTPX$_n$EPSE.SATP,

GTPE.GSAPX$_n$SGPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$ATPE.SGPG,
GTPE.GSAPX$_n$GTSE.SATP, GTPE.GSAPX$_n$TTPE.SGPG,
GTPE.GSAPX$_n$STPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$GTPE.SGPG,
GTPE.GSAPX$_n$GTPE.TPGS, GTPE.GSAPX$_n$SGSE.TGTP,
GTPE.GSAPX$_n$GTPE.GSAP, GTPE.GSAPX$_n$EPSE.SATP,
EPSE.SATPX$_n$SGPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$ATPE.SGPG,
EPSE.SATPX$_n$GTSE.SATP, EPSE.SATPX$_n$TTPE.SGPG,
EPSE.SATPX$_n$STPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTPE.SGPG,
EPSE.SATPX$_n$GTPE.TPGS, EPSE.SATPX$_n$SGSE.TGTP,
EPSE.SATPX$_n$GTPE.GSAP, o EPSE.SATPX$_n$EPSE.SATP,

en donde cada "." es un sitio de escisión por Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 50. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

SGPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP,
ATPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG,
ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG,
ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG,
GTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG,
GTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG,
GTPE.TPGSX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.GSAPX$_n$EPSE.SATP,
ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG,
ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG,
TTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, o STPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG,

en donde cada "." es un sitio de escisión por Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 30.

En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 1 a 20. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 15. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 3 a 7. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 10. En algunas modalidades, n es 9. En algunas modalidades, n es 4.

En algunas modalidades, X_n es PGTGTSAT, PGSGPGT, PGTTPGTT, PGTPPTST, PGTSPSAT, PGTGSAGT, PGTGGAGT, PGTSPGAT, PGTSGSGT, PGTSSAST, PGTGAGTT, PGTGSTST, GSEPATSG, APGTSTEP, PGTAGSGT, PGTSSGGT, PGTAGPAT, PGTPGTGT, PGTGGPTT, o PGTGSGST.

En algunas modalidades, X_n es TGTS, SGP, TTPG, TPPT, TSPS, TGSA, TGGA, TSPG, TSGS, TSSA, TGAG, TGST, EPAT, GTST, TAGS, TSSG, TAGP, TPGT, TGGP, o TGSG.

En algunas modalidades, ni el aminoácido N-terminal ni el aminoácido C-terminal del polipéptido quimérico están incluidos en un fragmento de código de barras.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende un ELNN con un motivo de secuencia no solapante que aparece solamente una vez dentro del ELNN, en donde el ELNN comprende adicionalmente un fragmento de código de barras que incluye al menos parte del motivo de secuencia no solapante que aparece solamente una vez dentro del ELNN.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende un primer ELNN con un primer fragmento de código de barras y un segundo ELNN con un segundo fragmento de código de barras, en donde ni el primer fragmento de código de barras ni el segundo fragmento de código de barras incluyen un glutamato que es inmediatamente adyacente a otro glutamato, si estuviera presente, en el ELNN que contiene el fragmento de código de barras.

En algunas modalidades, al menos uno de los fragmentos de códigos de barras comprende un glutamato en el extremo C-terminal del mismo.

En algunas modalidades, al menos uno de los fragmentos de códigos de barras tiene un aminoácido N-terminal que está precedido inmediatamente por un glutamato en el polipéptido quimérico.

En algunas modalidades, el glutamato que precede al aminoácido N-terminal del fragmento de código de barras no es inmediatamente adyacente a otro glutamato.

En algunas modalidades, al menos uno de los fragmentos de códigos de barras no incluye un segundo glutamato en una posición distinta del extremo C-terminal del fragmento de código de barras a menos que el segundo glutamato esté seguido inmediatamente por una prolina.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una sola cadena polipeptídica, en donde el polipéptido quimérico comprende un fragmento de código de barras que está en una posición dentro de la cadena polipeptídica que está a una distancia de 10 a 200 aminoácidos o de 10 a 125 aminoácidos del extremo N-terminal o del extremo C-terminal del polipéptido quimérico. En algunas modalidades, el primer ELNN está en el lado N-terminal del dominio de anticuerpo biespecífico, y en donde el primer fragmento de código de barras se sitúa a una distancia de 150, 100, o 50 aminoácidos del extremo N-terminal del polipéptido quimérico. En algunas modalidades, el segundo ELNN está en el lado C-terminal del dominio de anticuerpo biespecífico, y en donde el segundo fragmento de código de barras se sitúa a una distancia de 150, 100, o 50 aminoácidos del extremo C-terminal del polipéptido quimérico.

En algunas modalidades, al menos uno de los fragmentos de códigos de barras tiene al menos 4 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, al menos uno de los fragmentos de códigos de barras tiene de 4 a 20, de 5 a 15, de 6 a 12, o de 7 a 10 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, cada polipéptido máscara comprende un fragmento de código de barras que es enumerado en la Tabla 2 o divulgado en la Tabla 3a.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende un fragmento de código de barras que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SGPGSGPGTSE o SGPGTSPSATPE.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende un fragmento de código de barras que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a SGPGSGPGTSE y un fragmento de código de barras que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a SGPGTSPSATPE.

En algunas modalidades, el fragmento de código de barras consiste en los residuos A, E, G, S, P, y/o T.

En algunas modalidades, el fragmento de código de barras es parte de un péptido máscara.

En algunas modalidades, el péptido máscara es el primer ELNN o el segundo ELNN.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla D (SEQ ID NO: 1000-1009). En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de

identidad, con SEQ ID NO: 1000. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SEQ ID NO: 1001. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SEQ ID NO: 1002. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SEQ ID NO: 1003. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SEQ ID NO: 1004. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SEQ ID NO: 1005. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SEQ ID NO: 1006. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SEQ ID NO: 1007. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SEQ ID NO: 1008. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de

aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SEQ ID NO: 1009.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:

ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPE
SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE
SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE
EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT
SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
SEPATSGSETPGTSESATPEAGRSASHTPAGLTGPGTSESATPESQVQLVESGGG
VVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKVSDS
VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGRTWYDFNESDYWG
QGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYAN
WVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC
ALWYPNLWVFGGGTKLTVLSESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEVQLVE
SGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYAT
YYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHW
GQGTLVTVSSGTATPESGPGEAGRSASHTPAGLTGPATPESGPGTSESATPESGP
GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS
EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT
STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS
ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE
SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT

SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG
SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE
GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSE
PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE
TPGTSESAGEPEA (SEQ ID NO: 1000). En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con SEQ ID NO: 1000. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con SEQ ID NO: 1000. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91 % de identidad con SEQ ID NO: 1000. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad con SEQ ID NO: 1000. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 % de identidad con SEQ ID NO: 1000. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 % de identidad con SEQ ID NO: 1000. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID NO: 1000. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 % de identidad con SEQ ID NO: 1000. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 % de identidad con SEQ ID NO: 1000. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 % de identidad con SEQ ID NO: 1000. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad con SEQ ID NO: 1000. En algunas modalidades, el

polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100 % de identidad con SEQ ID NO: 1000.

En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPE
SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE
SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE
EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT
SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
SEPATSGSETPGTSESATPEAGRSASHTPAGLTGPGTSESATPESQVQLVESGGG
VVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKVSDS
VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGRTWYDFNESDYWG
QGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYAN
WVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC
ALWYPNLWVFGGGTKLTVLSESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEVQLVE
SGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYAT
YYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHW
GQGTLVTVSSGTATPESGPGEAGRSASHTPAGLTGPATPESGPGTSESATPESGP
GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS
EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT
STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS
ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE
SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT
SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG

SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE
GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSE
PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE
TPGTSESAGEPEA (SEQ ID NO: 1000).

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una composición farmacéutica que comprende el polipéptido quimérico descrito en el presente documento y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica está en una forma líquida o está congelada. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un dispositivo de inyección que comprende la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas modalidades, el dispositivo de inyección comprende una jeringa.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido quimérico descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un vector de expresión que comprende el polinucleótido descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una célula anfitriona que comprende el vector de expresión descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para producir el polipéptido quimérico descrito en el presente documento. En algunas

modalidades, el método comprende adicionalmente aislar el polipéptido quimérico de una célula anfitriona.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz del polipéptido quimérico descrito en el presente documento al sujeto.

En algunas modalidades, el cáncer comprende un tumor sólido. En algunas modalidades, el cáncer es un carcinoma. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de próstata. En algunas modalidades, el cáncer de próstata es cáncer de próstata metastásico. En algunas modalidades, el cáncer de próstata es independiente de andrógenos. En algunas modalidades, el cáncer de próstata es cáncer de próstata resistente a la castración no metastásico (nmCRPC). En algunas modalidades, el cáncer de próstata es cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (mCRPC).

En algunas modalidades, el método comprende adicionalmente administrar docetaxel al sujeto.

En algunas modalidades, el método comprende adicionalmente administrar un inhibidor de punto de control al sujeto. En algunas modalidades, el inhibidor de punto de control es un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, o un inhibidor de CTLA-4. En algunas modalidades, el inhibidor de punto de control es un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1. En algunas modalidades, el inhibidor de punto de control es pembrolizumab o cemiplimab.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad,

con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). Ciertos aspectos de

la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100 % de identidad con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81).

En algunas modalidades, el polipéptido conector es escindible por una proteasa que no es de mamífero. En algunas modalidades, la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

En algunas modalidades, el polipéptido conector conecta un primer radical polipeptídico a un segundo radical polipeptídico. En algunas modalidades, el primer radical polipeptídico es un dominio VL y el segundo radical polipeptídico es un dominio VH.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido de unión a antígeno que comprende un dominio VL y un dominio VH, en donde el dominio VL se conecta al dominio VH mediante un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81).

En algunas modalidades, el polipéptido conector es escindible por una proteasa que no es de mamífero. En algunas modalidades, la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

En algunas modalidades, el polipéptido de unión a antígeno es un scFv.

En algunas modalidades, el antígeno es CD3. En algunas modalidades, el antígeno es CD3 épsilon.

En algunas modalidades, el dominio VL es N-terminal con respecto al dominio VH. En algunas modalidades, el dominio VH es N-terminal con respecto al dominio VL.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una composición farmacéutica que comprende el polipéptido conector descrito en el presente documento o el polipéptido de unión a antígeno descrito en el presente documento, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica está en una forma líquida o está congelada. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un dispositivo de inyección que comprende la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas modalidades, el dispositivo de inyección comprende una jeringa.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una secuencia de polinucleótidos que codifica el conector descrito en el presente documento o el polipéptido de unión a antígeno descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un vector de expresión que comprende secuencia de polinucleótidos descrita en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una célula anfitriona que comprende el vector de expresión descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para producir el conector descrito en el presente documento o el polipéptido de unión a antígeno descrito en el presente documento. En algunas modalidades, el método comprende adicionalmente aislar el conector o el polipéptido de unión a antígeno de una célula anfitriona.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos escindible por proteasa que comprende la secuencia: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N. En algunas modalidades, X es S.

En algunas modalidades, el polipéptido aislado no es escindible por legumaína. En algunas modalidades, el polipéptido aislado no es escindible por legumaína en sangre, plasma, o suero humanos. En algunas modalidades, el polipéptido aislado no es escindible después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas. En algunas modalidades, el polipéptido aislado no es escindible después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas en sangre, plasma, o suero humanos.

En algunas modalidades, la legumaína escinde el polipéptido aislado en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 50 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde el polipéptido aislado en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 25 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde el polipéptido aislado en plasma humano a una

velocidad que es menor que aproximadamente 10 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde el polipéptido aislado en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde el polipéptido aislado en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 2,5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una composición farmacéutica que comprende el polipéptido aislado descrito en el presente documento, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica está en una forma líquida o está congelada. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un dispositivo de inyección que comprende la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas modalidades, el dispositivo de inyección comprende una jeringa.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido aislado descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un vector de expresión que comprende secuencia de polinucleótidos descrita en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una célula anfitriona que comprende el vector de expresión descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para producir el polipéptido aislado descrito en el presente documento. En algunas modalidades, el método comprende adicionalmente aislar el polipéptido aislado de una célula anfitriona.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos escindible por proteasa que comprende la secuencia: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N, en donde la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa conecta un primer radical polipeptídico a un segundo radical polipeptídico. En algunas modalidades, X es S.

En algunas modalidades, la proteína de fusión no es escindible por legumaína. En algunas modalidades, la proteína de fusión no es escindible por legumaína en sangre, plasma, o suero humanos. En algunas modalidades, la proteína de fusión no es escindible después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas. En algunas modalidades, la proteína de fusión no es escindible después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas en sangre, plasma, o suero humanos.

En algunas modalidades, la legumaína escinde la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 50 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 25 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde la secuencia de

aminoácidos escindible por proteasa en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 10 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína. En algunas modalidades, la legumaína escinde la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 2,5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

En algunas modalidades, el primer radical polipeptídico comprende un dominio de unión a antígeno y el segundo radical polipeptídico comprende un polipéptido de enmascaramiento.

En algunas modalidades, el primer radical polipeptídico comprende un dominio de unión a antígeno y el segundo radical polipeptídico es una citocina, una enzima, una hormona, un factor de crecimiento, un polipéptido quimioterapéutico, un polipéptido antiviral, o una toxina.

En algunas modalidades, el primer radical polipeptídico es una citocina, una enzima, una hormona, un factor de crecimiento, un polipéptido quimioterapéutico, un polipéptido antiviral, o una toxina y el segundo radical polipeptídico es un polipéptido de enmascaramiento.

En algunas modalidades, el polipéptido de enmascaramiento comprende un ELNN.

En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende una sola cadena polipeptídica, que comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, el primer polipéptido, después la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa,

después el segundo radical polipeptídico. En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende una sola cadena polipeptídica, que comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, el segundo polipéptido, después la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa, después el primer radical polipeptídico.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión descrita en el presente documento, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica está en una forma líquida o está congelada. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un dispositivo de inyección que comprende la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas modalidades, el dispositivo de inyección comprende una jeringa.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión descrita en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un vector de expresión que comprende secuencia de polinucleótidos descrita en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una célula anfitriona que comprende el vector de expresión descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para producir la proteína de fusión descrita en el presente documento. En algunas modalidades, el método comprende adicionalmente aislar la proteína de fusión de una célula anfitriona.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido ELNN que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATP.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido ELNN que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: ATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAGEPEA.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una proteína de fusión que comprende el polipéptido ELNN descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una composición farmacéutica que comprende el polipéptido ELNN descrito en el presente

documento, o la proteína de fusión descrita en el presente documento, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica está en una forma líquida o está congelada. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un dispositivo de inyección que comprende la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas modalidades, el dispositivo de inyección comprende una jeringa.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido ELNN descrito en el presente documento, o la proteína de fusión descrita en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un vector de expresión que comprende secuencia de polinucleótidos descrita en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una célula anfitriona que comprende el vector de expresión descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para producir el polipéptido ELNN descrito en el presente documento, o la proteína de fusión descrita en el presente documento.

En algunas modalidades, el método de la reivindicación 288, que comprende adicionalmente aislar el polipéptido ELNN o la proteína de fusión, de una célula anfitriona.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un fragmento de código de barras que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de

identidad, o 100 % de identidad, con SGPGTGTSATPE, SGPGSGPGTSE, SGPGTTPGTTPE, SGPGTPPTSTPE, SGPGTSPSATPE, SGPGTGSAGTPE, SGPGTGGAGTPE, SGPGTSPGATPE, SGPGTSGSGTPE, SGPGTSSASTPE, SGPGTGAGTTPE, SGPGTGSTSTPE, TPGSEPATSGSE, GSAPGTSTEPSE, SGPGTAGSGTPE, SGPGTSSGGTPE, SGPGTAGPATPE, SGPGTPGTGTPE, SGPGTGGPTTPE, o SGPGTGSGSTPE.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un fragmento de código de barras que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SGPGSGPGTSE o SGPGTSPSATPE.

En algunas modalidades, el fragmento de código de barras comprende la secuencia de aminoácidos: SGPGSGPGTSE. En algunas modalidades, el fragmento de código de barras comprende la secuencia de aminoácidos: SGPGTSPSATPE.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una proteína de fusión que comprende el fragmento de código de barras descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una proteína de fusión que comprende un sitio de escisión por Glu-C que comprende una de las siguientes secuencias de aminoácidos: ATPESGPG, SGSETPGT, y GTSESATP.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una proteína de fusión que comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SGPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, SGPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, SGPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, SGPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, SGPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP,

SGPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, ATPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, ATPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, GTSE.SATPX$_n$SGPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$ATPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$GTSE.SATP, GTSE.SATPX$_n$TTPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$STPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$GTPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$GTPE.TPGS, GTSE.SATPX$_n$SGSE.TGTP, GTSE.SATPX$_n$GTPE.GSAP, GTSE.SATPX$_n$EPSE.SATP, TTPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, TTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, TTPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, TTPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, TTPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, STPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, STPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, STPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, STPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, STPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, GTPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, GTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, GTPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, GTPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP,

GTPE.TPGSX$_n$SGPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$GTSE.SATP, GTPE.TPGSX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$STPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$GTPE.TPGS, GTPE.TPGSX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.TPGSX$_n$GTPE.GSAP, GTPE.TPGSX$_n$EPSE.SATP, SGSE.TGTPX$_n$SGPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$ATPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$GTSE.SATP, SGSE.TGTPX$_n$TTPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$STPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$GTPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$GTPE.TPGS, SGSE.TGTPX$_n$SGSE.TGTP, SGSE.TGTPX$_n$GTPE.GSAP, SGSE.TGTPX$_n$EPSE.SATP, GTPE.GSAPX$_n$SGPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$GTSE.SATP, GTPE.GSAPX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$STPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$GTPE.TPGS, GTPE.GSAPX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.GSAPX$_n$GTPE.GSAP, GTPE.GSAPX$_n$EPSE.SATP, EPSE.SATPX$_n$SGPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$ATPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTSE.SATP, EPSE.SATPX$_n$TTPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$STPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTPE.TPGS, EPSE.SATPX$_n$SGSE.TGTP, EPSE.SATPX$_n$GTPE.GSAP, o EPSE.SATPX$_n$EPSE.SATP, en donde cada "." es un sitio de escisión por Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 50.

En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SGPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG,

ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.GSAPX$_n$EPSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, o STPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, en donde cada "." es un sitio de escisión por Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 30.

En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 1 a 20. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 15. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 3 a 7. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 10. En algunas modalidades, n es 9. En algunas modalidades, n es 4.

En algunas modalidades, X$_n$ es PGTGTSAT, PGSGPGT, PGTTPGTT, PGTPPTST, PGTSPSAT, PGTGSAGT, PGTGGAGT, PGTSPGAT, PGTSGSGT, PGTSSAST, PGTGAGTT, PGTGSTST, GSEPATSG, APGTSTEP, PGTAGSGT, PGTSSGGT, PGTAGPAT, PGTPGTGT, PGTGGPTT, o PGTGSGST.

En algunas modalidades, X$_n$ es TGTS, SGP, TTPG, TPPT, TSPS, TGSA, TGGA, TSPG, TSGS, TSSA, TGAG, TGST, EPAT, GTST, TAGS, TSSG, TAGP, TPGT, TGGP, o TGSG.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una composición farmacéutica que comprende el fragmento de código de barras descrito en el presente documento, o la proteína de fusión descrita en el presente documento, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica está en una forma líquida o está congelada. En

algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un dispositivo de inyección que comprende la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas modalidades, el dispositivo de inyección comprende una jeringa.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una secuencia de polinucleótidos que codifica el fragmento de código de barras descrito en el presente documento, o la proteína de fusión descrita en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un vector de expresión que comprende secuencia de polinucleótidos descrita en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una célula anfitriona que comprende el vector de expresión descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para producir el fragmento de código de barras descrito en el presente documento, o la proteína de fusión descrita en el presente documento. En algunas modalidades, el método comprende adicionalmente aislar el fragmento de código de barras o la proteína de fusión de una célula anfitriona.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PSMA, que comprenden un dominio VHH o un fragmento del mismo que comprenden tres CDR de VHH, en donde las tres CDR de VHH comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de la siguiente secuencia de aminoácidos: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS

WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PSMA, que comprenden las siguientes CDR: una CDR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG; una CDR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRKVSDSVKG; y una CDR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AASNKEYGRTWYDFNESDY.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento comprenden una o más de las siguientes FR: una FR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS; una FR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WFRQAPGKEREFVG; una FR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC; y una FR4 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %,

94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTQVTVSS.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PSMA, que comprenden las siguientes CDR: una CDR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG; una CDR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRK; y una CDR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AASNKEYGRTWYDFNESDY.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento comprenden una o más de las siguientes FR: una FR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS; una FR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WFRQAPGKEREFVG; una FR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con VSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC; y una FR4 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %,

94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTQVTVSS.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PSMA, que comprenden un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento son un anticuerpo aislado o fragmente del mismo.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PSMA, que comprenden un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de PSMA.2, PSMA.3, PSMA.5, PSMA.6, PSMA.262, o PSMA.263.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PSMA, que comprenden un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVX_{17}GWFRQAPGKEREFVGAX $_{18}$SWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYX_{19}C$X_{20}$$X_{21}$S

NKX$_{22}$YGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS, en donde X$_{17}$, X$_{18}$, X$_{19}$, X$_{20}$, X$_{21}$, y X$_6$ corresponden cada uno, individualmente, a cualquier aminoácido de origen natural. En algunas modalidades, X$_{17}$ corresponde a M o W, X$_{18}$ corresponde a M o I, X$_{19}$ corresponde a F o Y, X$_{20}$ corresponde a A o G, X$_{21}$ corresponde a A o G, y/o X$_{22}$ corresponde a L, W, R, D, E, o G.

En algunas modalidades, el PSMA comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

KSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQ WKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVS DIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARYGKVFR GNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNG AGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSAPPDSS WRGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVI LGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFG LLGSTEWAEENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELK SPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRAR YTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANS IVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSAVKNFTEIASKF SERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYA GESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA (SEQ ID NO: 1044).

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a CD3, que comprenden un dominio VL y un dominio VH, en donde: (i) el dominio VL comprende las CDR de VL de la secuencia de aminoácidos de

ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO: 361); o (ii) el dominio VH comprende las CDR de VH de la secuencia de aminoácidos de EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311).

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenden una o más de las siguientes CDR: un dominio VL CDR1 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RSSNGAVTSSNYAN; un dominio VL CDR2 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTNKRAP; un dominio VL CDR3 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ALWYPNLWV; un dominio VH CDR1 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GFTFSTYAMN; un dominio VH CDR2 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RIRTKRNNYATYYADSVKG; y/o un dominio VH CDR3 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %,

96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con HENFGNSYVSWFAH.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento comprenden una o más de las siguientes FR: una FR1 del dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC; una FR2 del dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVQQKPGQAPRGLIG; una FR3 del dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC; una FR4 del dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con FGGGTKLTVL; una FR1 del dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS; una FR2 del dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVRQAPGKGLEWVG; una FR3 del dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR; y/o una FR4 del dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %,

94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTLVTVSS.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento comprenden un dominio VL.

En algunas modalidades, el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO: 361).

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento comprenden un dominio VH.

En algunas modalidades, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311).

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a CD3, que comprenden un dominio VL y un dominio VH, en donde el par de secuencia de aminoácidos de dominio VL de SEQ ID NO/secuencia de aminoácidos de dominio VH de SEQ ID NO se selecciona del grupo que consiste en: 896/897; 902/903; 700/701; 702/703; 716/717; 718/719; 728/729; 736/737; 738/739; 740/741; 742/743; 744/745; 746/747; 748/749; 750/751; 752/753; 754/755; 756/757; 758/759; 760/761; 762/763; 764/765; 766/767; 774/775; 776/777; 790/791; 792/793; 798/799; 800/801; 806/807; 808/809; 814/815; 816/817; 822/823; 824/825; o 826/867.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento del mismo son un anticuerpo aislado o fragmento del mismo.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento del mismo son un anticuerpo.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento del mismo son un Fab, un scFv, o un anticuerpo monoclonal.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento del mismo es un scFv.

En algunas modalidades, el dominio VL es N-terminal con respecto al dominio VH in el scFv

En algunas modalidades, el dominio VL es C-terminal con respecto al dominio VH in el scFv.

En algunas modalidades, el scFv comprende un conector entre el dominio VL y el dominio VH, en donde el conector consiste en los residuos A, E, G, S, P, y/o T.

En algunas modalidades, el conector es un ELNN.

En algunas modalidades, el ELNN es escindible por una proteasa que no es de mamífero. En algunas modalidades, la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

En algunas modalidades, ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81).

En algunas modalidades, el scFv comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVLSESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEVQLVESGGGIVQPGGSLRLS

CAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISR DDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS.

En algunas modalidades, el CD3 es CD3 épsilon.

En algunas modalidades, el CD3 épsilon comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGS DEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD (SEQ ID NO: 1043)

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo descritos en el presente documento, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica está en una forma líquida o está congelada. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un dispositivo de inyección que comprende la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas modalidades, el dispositivo de inyección comprende una jeringa.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo descritos en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un vector de expresión que comprende secuencia de polinucleótidos descrita en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una célula anfitriona que comprende el vector de expresión descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para producir el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo descritos en el presente documento. En algunas modalidades, el método comprende adicionalmente aislar el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una célula anfitriona.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de anticuerpo anti-PSMA que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descritos en el presente documento y/o un dominio de anticuerpo anti-CD3 que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descritos en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de anticuerpo anti-PSMA que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descritos en el presente documento y un dominio de anticuerpo anti-CD3 que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descritos en el presente documento.

En algunas modalidades, la afinidad del dominio de anticuerpo anti-PSMA por PSMA es mayor que la afinidad del dominio de anticuerpo anti-CD3 por CD3. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un acoplador de células T.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo multiespecífico descrito en el presente documento, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica está en una forma líquida o está congelada. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula

como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un dispositivo de inyección que comprende la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas modalidades, el dispositivo de inyección comprende una jeringa.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo multiespecífico descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un vector de expresión que comprende secuencia de polinucleótidos descrita en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una célula anfitriona que comprende el vector de expresión descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para producir el anticuerpo multiespecífico descrito en el presente documento. En algunas modalidades, el método comprende adicionalmente aislar el anticuerpo multiespecífico de una célula anfitriona.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un acoplador de células T que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) y un segundo dominio de unión a antígeno que se une al receptor de células T del cúmulo de diferenciación 3 (CD3), en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS
WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR
TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549); y el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT
NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL
TVL (SEQ ID NO: 361) y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT
KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS
YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311).

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una composición farmacéutica que comprende el acoplador de células T descrito en el presente documento, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica está en una forma líquida o está congelada. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un dispositivo de inyección que comprende la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas modalidades, el dispositivo de inyección comprende una jeringa.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una secuencia de polinucleótidos que codifica el acoplador de células T descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un vector de expresión que comprende secuencia de polinucleótidos descrita en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una célula anfitriona que comprende el vector de expresión descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para producir el acoplador de células T descrito en el presente documento. En algunas modalidades, el método comprende adicionalmente aislar el acoplador de células T de una célula anfitriona.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un acoplador de células T activable por proteasa (paTCE) que comprende un acoplador de células T (TCE) descrito en el presente documento, en forma de una sola cadena polipeptídica, en donde el extremo N-terminal del TCE está fusionado a un primer polipéptido de enmascaramiento por un primer conector escindible por proteasa y el extremo C-terminal del TCE está fusionado a un segundo polipéptido de enmascaramiento por un segundo conector escindible por proteasa.

En algunas modalidades, el primer polipéptido de enmascaramiento es un primer ELNN. En algunas modalidades, el segundo polipéptido de enmascaramiento es un segundo ELNN.

En algunas modalidades, el TCE comprende un VHH anti-PSMA que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS

WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

En algunas modalidades, el TCE comprende un scFv anti-CD3 que comprende un dominio VH que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311) y un dominio VL que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO: 361).

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una composición farmacéutica que comprende el paTCE descrito en el presente documento, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica está en una forma líquida o está congelada. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un dispositivo de inyección que comprende la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas modalidades, el dispositivo de inyección comprende una jeringa.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una secuencia de polinucleótidos que codifica el paTCE descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un vector de expresión que comprende secuencia de polinucleótidos descrita en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una célula anfitriona que comprende el vector de expresión descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para producir el paTCE descrito en el presente documento. En algunas modalidades, el método comprende adicionalmente aislar el paTCE de una célula anfitriona.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un polipéptido quimérico, polipéptido aislado, proteína de fusión, polipéptido de unión a antígeno, anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a un PSMA, anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a CD3, anticuerpo multiespecífico, acoplador de células T, o paTCE, producidos mediante el método descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N.

En algunas modalidades, el polinucleótido es un vector.

En algunas modalidades, el polinucleótido es un polinucleótido aislado.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una línea celular que expresa un polipéptido exógeno que comprende la secuencia de aminoácidos: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N.

En algunas modalidades, el polipéptido exógeno es una proteína de fusión descrita en el presente documento.

En algunas modalidades, la línea celular está en cultivo o está congelada en un recipiente de vidrio o plástico.

En algunas modalidades, la línea celular está en un biorreactor.

En algunas modalidades, la célula es una línea celular estable.

En algunas modalidades, la línea celular es una célula de mamífero.

En algunas modalidades, la línea celular es una célula CHO o una célula HEK293.

En algunas modalidades, la línea celular es una célula procariótica.

En algunas modalidades, la línea celular es una célula de *Escherichia coli*.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un animal no humano que comprende un polipéptido exógeno que comprende la secuencia de aminoácidos: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N. En algunas modalidades, X es D, E, o Q. En algunas modalidades, X es G, A, V, L, I. En algunas modalidades, X es P. En algunas modalidades, X es F, Y, o W. En algunas modalidades, X es H, K, o R. En algunas modalidades, X es S, C, U, T, o M. En algunas modalidades, X es S.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-PSMA o fragmento descrito en el presente documento y una proteína biológicamente activa.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-CD3 o fragmento descrito en el presente documento y una proteína biológicamente activa.

En algunas modalidades, la proteína biológicamente activa comprende una citocina, una enzima, una hormona, un factor de crecimiento, un polipéptido quimioterapéutico, un polipéptido antiviral, o una toxina.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un producto inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-PSMA o fragmento descrito en el presente documento y un compuesto.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un producto inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-CD3 o fragmento descrito en el presente documento y un compuesto.

En algunas modalidades, el compuesto comprende un agente quimioterapéutico.

En algunas modalidades, el compuesto comprende un agente de diagnóstico.

En algunas modalidades, el compuesto comprende una toxina, una molécula radiactiva, un agente de contraste, o un fármaco.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a CD3, que comprenden una región variable de cadena pesada (VH) que comprende tres CDR de cadena pesada, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende tres CDR de cadena ligera, en donde las tres CDR de cadena pesada comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTK RNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYV SWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311) y las tres CDR de cadena ligera comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 361), y en donde las CDR se identifican mediante la definición de Kabat, la definición de Chotia, la definición de AbM, la definición de IMGT, o la definición de contacto. En algunas modalidades, el anticuerpo es un scFv.

En el presente documento se incluye una proteína de unión a antígeno que comprende: (i) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a, o 100 % idéntica a, una secuencia de dominio variable de cadena ligera que comprende una

secuencia de CDR seleccionada del grupo que consiste en RSSNGAVTSSNYAN, GTNKRAP, y ALWYPNLWV, y (ii) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a, o 100 % idéntica a, un una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de CDR seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: GFTFSTYAMN, RIRTKRNNYATYYADSVKG, y HENFGNSYVSWFAH, en donde la proteína de unión a antígeno se une específicamente a CD3. En algunas modalidades, el anticuerpo es un scFv.

En el presente documento se describe un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a CD3, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden tres secuencias de regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena ligera de SEQ ID NO: RSSNGAVTSSNYAN, GTNKRAP, y ALWYPNLWV, y tres secuencias de regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada de GFTFSTYAMN, RIRTKRNNYATYYADSVKG, y HENFGNSYVSWFAH. En algunas modalidades, el anticuerpo es un scFv.

En el presente documento se incluye un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a CD3 que comprenden la secuencia de aminoácidos de DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGS DEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD (SEQ ID NO: 1043), que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR de cadena pesada, y una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR de cadena ligera, en donde las tres CDR de cadena pesada comprenden la CDR1, CDR2 y CDR3 de

EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311), y las tres CDR de cadena ligera comprenden la CDR1, CDR2 y CDR3 de ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO: 361). En algunas modalidades, la CDR1 de cadena pesada comprende GFTFSTYAMN, la CDR2 de cadena pesada comprende RIRTKRNNYATYYADSVKG, la CDR3 de cadena pesada comprende HENFGNSYVSWFAH, la CDR1 de cadena ligera comprende RSSNGAVTSSNYAN, la CDR2 de cadena ligera comprende GTNKRAP, y la CDR3 de cadena ligera comprende ALWYPNLWV. En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada comprende EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311). En algunas modalidades, la región variable de cadena ligera comprende ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO: 361). En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada comprende EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311) y la región variable de cadena ligera comprende

ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO: 361).

En algunas modalidades, en el presente documento se incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a CD3 (*p. ej*., una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 311 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 361) con una K_D de aproximadamente 300 nM o menos, p. ej., según lo medido mediante resonancia de plasmón de superficie. En algunas modalidades, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo muestran una K_D de aproximadamente 200 nM o menos, aproximadamente 150 o menos, aproximadamente 100 nM o menos, o aproximadamente 75 nM o menos.

En el presente documento se proporcionan un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a CD3 (p. ej., una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 311 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 361), que comprenden una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden: (a) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311) y una región variable de cadena

ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO: 361), caracterizados por una afinidad por CD3 (K_D) de aproximadamente 100 nM o menos; (b) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311) y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO: 361), caracterizados por una afinidad por CD3 (K_D) de aproximadamente 300 nM o menos; o (c) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311) y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT

NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO: 361), caracterizados por una afinidad por CD3 (K_D) de aproximadamente 75 nM o menos.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a PSMA, que comprenden un dominio VHH que comprende tres CDR de VHH, en donde las tres CDR de VHH comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549), en donde las CDR se identifican mediante la definición de Kabat, la definición de Chotia, la definición de AbM, la definición de IMGT, o la definición de contacto.

En el presente documento se incluye una proteína de unión a antígeno que comprende: (i) un dominio VHH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a, o 100 % idéntica a, una secuencia de CDR de VHH seleccionada del grupo que consiste en GRTFGIYVWG, AMSWSGSNRK, y AASNKEYGRTWYDFNESDY, en donde la proteína de unión a antígeno se une específicamente a PSMA.

En el presente documento se incluye un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a PSMA que comprenden la secuencia de aminoácidos de KSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQ WKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVS DIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARYGKVFR GNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNG

AGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSAPPDSS
WRGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVI
LGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFG
LLGSTEWAEENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELK
SPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRAR
YTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANS
IVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSAVKNFTEIASKF
SERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYA
GESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA (SEQ ID NO: 1044), que comprende una región VHH que comprende tres CDR de VHH de QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549). En algunas modalidades, la CDR1 de VHH comprende GRTFGIYVWG, la CDR2 de VHH comprende AMSWSGSNRK, y la CDR3 de VHH comprende AASNKEYGRTWYDFNESDY. En algunas modalidades, la región VHH comprende QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

En algunas modalidades, en el presente documento se incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a PSMA (*p. ej.*, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 549) con una K_D de aproximadamente 300 nM o menos, *p. ej.*, según lo medido mediante resonancia de plasmón de superficie. En algunas modalidades, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo muestran una K_D de aproximadamente 200 nM o menos,

aproximadamente 150 o menos, aproximadamente 100 nM o menos, o aproximadamente 50 nM o menos.

En el presente documento se proporcionan un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a PSMA (*p. ej.*, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 549), que comprende (a) una región VHH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549), caracterizados por una afinidad por PSMA (K_D) de aproximadamente 100 nM o menos; (b) una región VHH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549), caracterizados por una afinidad por PSMA (K_D) de aproximadamente 300 nM o menos; o (c) una región VHH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549) caracterizados por una afinidad por PSMA (K_D) de aproximadamente 50 nM o menos.

La presente divulgación incluye un acoplador de células T biespecífico que comprende (i) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se

unen específicamente a CD3 humano (una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 311 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 361) proporcionados en el presente documento; y (ii) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a PSMA humano (SEQ ID NO: 549) proporcionados en el presente documento.

Varias características de esta divulgación se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente divulgación haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que establece modalidades ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1A** describe una representación esquemática no limitante de un paTCE ilustrativo. La FIG. 1B describe una representación esquemática de paTCE completamente desenmascarado (un uTCE) y metabolitos enmascarados individualmente paTCE(1x-N) y paTCE(1x-C) de un paTCE ilustrativo como se muestra en la FIG. 1A.

Las **FIG. 2A-FIG. 2D** representan datos de caracterización biofísica de los anticuerpos variantes contra PMSA.2. La FIG. 2A representa las concentraciones de anticuerpos variantes contra PMSA.2. La FIG. 2B representa la unión relativa a PSMA de los anticuerpos variantes contra PMSA.2. La FIG. 2C representa la estabilidad térmica de los anticuerpos variantes contra PMSA.2 medida por la concentración de monómero (pM) a 62 °C. La FIG. 2D representa la estabilidad

térmica de los anticuerpos variantes contra PMSA.2 medida por la concentración de monómero (pM) a 65 °C. Los números de clones de AC de los uTCE probados se muestran en las figuras. En estos experimentos se utilizaron uTCE en lugar de paTCE.

Las **FIG. 3A**-**FIG. 3C** representan datos de caracterización biofísica de anticuerpos variantes contra PMSA.3. La FIG. 3A representa la unión relativa a PSMA de los anticuerpos variantes contra PMSA.3. La FIG. 3B y FIG. 3C representan la estabilidad térmica de los anticuerpos variantes contra PMSA.3 medida por la concentración de monómero (FIG. 3B) o la concentración de producto agregado (FIG. 3C) (pM) a 63,5 °C. Los números de clones de AC de los uTCE probados se muestran en las figuras. En estos experimentos se utilizaron uTCE en lugar de paTCE.

La **FIG. 4** representa puntuaciones de PTE de variantes de PSMA y variantes de CD3 representativas. El gráfico muestra moléculas con Anticuerpos Antifármaco (ADA) conocidos y su puntuación de PTE correspondiente. La puntuación más alta indica una mayor probabilidad de tener supuestos epítopos de células T.

La **FIG. 5** representa la proliferación de células T en ensayo de inmunogenicidad EpiScreen™ DC: T cell. Se probaron PSMA.350 y el control positivo KLH. Para cada fecha de donante, cada barra de izquierda a derecha representa el Día 9, el Día 10, el Día 11 y el Día 12.

La **FIG. 6A** representa evaluaciones de puntuación de PTE utilizando el algoritmo PTE interno v22 para anticuerpos anti-CD3 de la agrupación 2. La **FIG. 6B** representa un porcentaje de anticuerpos restantes después de un ensayo de estabilidad térmica.

La **FIG. 7A** representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos RSR-2295 y RSR-3213 y proteasas capaces de escindirlas. La **FIG. 7B** representa la digestión

con proteasas in vitro de paTCE que emplean RSR-2295 o RSR-3213. La secuencia RSR-3213 se modifica para reducir sustancialmente la escisión por la legumaína.

La **FIG. 8A** y la **FIG. 8B** representan la estabilidad plasmática relativa de paTCE que emplean RSR-2295 o RSR-3213, medida el día 0 y el día 7. En la FIG. 8A, RSR-2295 empleó el fluoróforo SCy5.5 y RSR-3213 empleó el fluoróforo SCy7.5. En la FIG. 8B, el RSR-2295 empleó el fluoróforo SCy7.5 y el RSR-3213 empleó el fluoróforo SCy5.5. La **FIG. 8C** representa la escisión observada *in vivo* a partir de productos homogeneizados de tumores de 3 modelos de tumores de ratón diferentes. Para cada conjunto de gráficos de barras (es decir, % 1x-C, % 1x-N, % uTCE), cada barra de izquierda a derecha representa B1, B2, B3, B4, A1, A2, A3, A4, 43-1, 43-2, 43-3 y 43-4. B1-B4 representan 4 ratones diferentes de un primer modelo de tumor (NCI-N87). A1-A4 representan 4 ratones diferentes de un segundo modelo de tumor (HT-29). 43-1 – 43-4 representan 4 ratones diferentes de un tercer modelo de tumor (HT-55). La **FIG. 8D** describe el % del total de los 3 metabolitos más paTCE (paTCE, 1x-N, 1x-C y uTCE) cuando se emplean RSR-2295 o RSR-3213.

La **FIG. 9** representa la captación tumoral relativa de paTCE que emplean RSR-2295 o RSR-3213. La razón plasma:tumor se calculó en 3 modelos de tumores de ratón diferentes (4 ratones por modelo de tumor). Hay un “Ratón 1” para cada uno de los 3 modelos de tumores diferentes, un “Ratón 2” para cada uno de los 3 modelos de tumores diferentes, un “Ratón 3” para cada uno de los modelos de tumores diferentes y un “Ratón 4” para cada uno de los 3 modelos de tumores diferentes.

La **FIG. 10** representa gráficos de la actividad de unión de células CHO transfectadas con PSMA contra PSMA humano o PSMA de cino entre AC3092 (AMX-500-P1) y AC3896 (AMX-500-P4; también denominado aquí simplemente AMX-500). La unión a

la superficie se detectó con un anticuerpo secundario marcado específico para el scFv anti-CD3.

La **FIG. 11A** y la **FIG. 11B** representan curvas de dosis-respuesta de citotoxicidad relativa *in vitro* de células LNCaP PSMA^{alto} (FIG. 11A) y células 22Rv1 PSMA^{bajo} (FIG. 11B).

Las **FIG. 12A**-**FIG. 12C** representan curvas de dosis-respuesta de citotoxicidad relativa *in vitro* de células LNCaP PSMA^{alto} (FIG. 12A y FIG. 12B) y células 22Rv1 PSMA^{bajo} (FIG. 12C) con 3 muestras de PBMC humanas de donantes diferentes.

La **FIG. 13A** y la **FIG. 13B** representan un gráfico de citotoxicidad relativa *in vitro* de células LNCaP PSMA^{alto} del donante 1 incubadas con diversas concentraciones de AMX-500(uTCE), AMX-500, AMX-500(1x-N), AMX-500(1x-C), y AMX-500(SinSitiodeEscisión). La FIG. 13A representa los resultados del ensayo del Donante 1. La FIG. 13B muestra resultados similares de los Donantes 2-5.

La **FIG. 14A** y la **FIG. 14B** representan un gráfico de citotoxicidad relativa *in vitro* de células 22Rv1 PSMA^{bajo} del donante 1 incubadas con diversas concentraciones de AMX-500(uTCE), AMX-500, AMX-500(1x-N), AMX-500(1x-C), y AMX-500(SinSitiodeEscisión). La FIG. 14A representa los resultados del ensayo del Donante 1. La FIG. 14B muestra resultados similares de los Donantes 2 y 3.

La **FIG. 15** representa gráficos de liberación de citocinas *in vitro* de células LNCaP PSMA^{alto} incubadas con diversas concentraciones de AMX-500(uTCE), AMX-500, AMX-500(1x-N), AMX-500(1x-C) y AMX-500(SinSitiodeEscisión). Las células se incubaron conjuntamente con PBMC a una razón de 10:1 de células PBMC con respecto a LNCap. Se muestran los niveles de citocinas INF-γ, TNF-α, IL-6, IL-10, GM-CSF, IL-1β, IL-2, IL-4 y MCP-1.

La **FIG. 16** representa gráficos de expresión de CD69, CD25 y PD-1 en células T CD4+ de un cocultivo de LNCaP PSMA^{alto}/PBMC que se incubó con diversas concentraciones de AMX-500(uTCE), AMX-500, AMX-500(1x- N), AMX-500(1x-C) y AMX-500(SinSitiodeEscisión). Las células se incubaron conjuntamente con PBMC a una razón de 10:1 de células PBMC con respecto a LNCap. Las PBMC se tomaron del donante 1.

La **FIG. 17** representa gráficos de expresión de CD69, CD25 y PD-1 en células T CD8+ de un cocultivo de LNCaP PSMA^{alto}/PBMC que se incubó con diversas concentraciones de AMX-500(uTCE), AMX-500, AMX-500(1x- N), AMX-500(1x-C) y AMX-500(SinSitiodeEscisión). Las células se incubaron conjuntamente con PBMC a una razón de 10:1 de células PBMC con respecto a LNCap. Las PBMC se tomaron del Donante 1.

La **FIG. 18** representa gráficos de expresión de CD69, CD25 y PD-1 en células T CD4+ y CD8+ de un cocultivo de LNCaP PSMAalto/PBMC que se incubó con diversas concentraciones de AMX-500(uTCE), AMX-500, AMX-500(1x-N), AMX-500(1x-C) y AMX-500(SinSitiodeEscisión). Las células se incubaron conjuntamente con PBMC a una razón de 10:1 de células PBMC con respecto a LNCap. Las PBMC se tomaron del Donante 2.

La **FIG. 19** representa gráficos de expresión de CD69, CD25 y PD-1 en células T CD4+ y CD8+ de un cocultivo LNCaP PSMA^{alto}/PBMC que se incubó con diversas concentraciones de AMX-500(uTCE), AMX-500, AMX-500(1x-N), AMX-500(1x-C) y AMX-500(SinSitiodeEscisión). Las células se incubaron conjuntamente con PBMC a una razón de 10:1 de células PBMC con respecto a LNCap. Las PBMC se tomaron del Donante 3.

La **FIG. 20A** y la **FIG. 20B** representan la unión relativa a la diana de AMX-500 (FIG. 20A) y AMX-500-P7 (AC3934, FIG. 20B) a aproximadamente 6.000 proteínas de membrana de HEK293T diferentes.

La **FIG. 21** representa gráficos del volumen del tumor de modelos de ratón con tumor de próstata humano. Se generaron modelos de ratón tumoral con células 22Rv1 $PSMA^{bajo}$, células LNCaP $PSMA^{alto}$ o células C4-2 $PSMA^{alto}$. Para el modelo 22Rv1, paTCE AMX-500 se dosificó a 2 mg/kg, 16 nmoles/kg y TCE desenmascarado (uTCE) de AMX-500 se dosificó a 0,35 mg/kg, 7,6 nmoles/kg. Para el modelo LNCaP, paTCE AMX-500 se dosificó a 3 mg/kg, 24 nmoles/kg y uTCE AMX-500 se dosificó a 0,35 mg/kg, 7,6 nmoles/kg. Para el modelo C4-2, la dosis A fue de 7,5 mg/kg, 59 nmoles/kg, BIW y la dosis B fue de 3,5 mg/kg, 27 nmoles/kg, BIW.

La **FIG. 22** representa gráficos de volumen del tumor de modelos de ratón con tumor de próstata humano de células LNCaP $PSMA^{alto}$.

La **FIG. 23** representa gráficos del volumen del tumor de modelos de ratón con tumor de próstata humano de células 22Rv1 $PSMA^{bajo}$.

La **FIG. 24** representa un gráfico del volumen del tumor de un modelo de ratón con tumor de próstata humano al que se le administró AMX-500, el anticuerpo anti-PD-1 pembrolizumab o la combinación de AMX-500 y pembrolizumab.

La **FIG. 25** representa la distribución tisular de AMX-500 en un modelo de tumor de ratón.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Existe una importante necesidad no satisfecha en la terapia contra el cáncer de una modalidad de tratamiento biespecífico dirigido a PSMA que sea eficaz contra tumores sólidos, particularmente tumores sólidos que están presentes en un microambiente inmunológicamente frío. Si bien se ha demostrado que los TCE son efectivas para inducir la remisión de ciertos cánceres, no han llevado al desarrollo de terapias generalizadas debido a su potencia extrema y sus toxicidades dirigidas a los tumores en tejidos sanos.

Sin vincularse a ninguna teoría científica, los TCE forman un puente entre las células T y las células tumorales y activan la destrucción de las células tumorales mediada por células T e inician aún más una cascada de amplificación de citocinas. La cascada de amplificación de citocinas puede promover una mayor destrucción de células tumorales y potencialmente proporcionar inmunidad a largo plazo. Las células T activadas por TCE liberan perforina/granzimas citolíticas de una manera independiente del reconocimiento antígeno-MHC. Esto crea una respuesta doble: muerte directa de las células tumorales y amplificación de la destrucción del tumor mediante el inicio de una poderosa respuesta de citocinas de las células tumorales. La muerte directa de las células tumorales da como resultado la liberación de antígenos tumorales. La respuesta de las citocinas puede incluir, entre otros, un aumento del interferón-g que estimula la actividad de las células T CD8 y estimula la presentación de antígenos por parte de las APC; aumento de IL2, que provoca una mayor proliferación de células T activadas, y aumento de la respuesta CXCL9 y 10, que aumenta el reclutamiento de células T. Juntos, la liberación de antígenos tumorales y el inicio de la respuesta de citocinas dan como resultado la activación

de la respuesta de las células T endógenas que potencialmente causa la diseminación del epítopo para inducir inmunidad a largo plazo.

Un desafío de toxicidad con los TCE surge del hecho de que muchos objetivos tumorales también se expresan, hasta cierto punto, en tejido sano, y las células normales también pueden producir la respuesta de citocinas que da como resultado el síndrome de liberación de citocinas (SLC). Estas dos poderosas respuestas del tejido sano a la activación de las células T por los TCE a menudo dan como resultado una falta general de índice terapéutico aceptable para estos agentes.

La presente divulgación proporciona TCE activables por proteasas (paTCE) que abordan una necesidad no satisfecha y son superiores en uno o más aspectos, incluida la semivida terminal mejorada, la administración dirigida y/o la proporción terapéutica mejorada con toxicidad reducida para los tejidos sanos en comparación con a terapias de anticuerpos convencionales o terapias de anticuerpos biespecíficos que son activos tras la inyección.

Se incluyen compuestos, composiciones y métodos que superan los inconvenientes de los TCE existentes proporcionando paTCE dirigidos al PSMA (denominados paTCE de PSMA e ilustrados como AMX-500).

AMX-500 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 1000. Sin vincularse a ninguna teoría científica, se entiende que los paTCE descritos en el presente documento explotan la actividad de proteasa desregulada presente en tumores frente a tejidos sanos, lo que permite la expansión. del índice terapéutico. El núcleo del paTCE comprende dominios de unión a antígeno; uno se dirige a CD3 y el otro a PSMA. Los dos dominios de unión a antígeno pueden, en modalidades ejemplares, estar en dos formatos de anticuerpo diferentes

(como, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de cadena única (scFv) y un VHH), o el mismo formato de anticuerpo (como, por ejemplo, scFv). Se pueden utilizar muchos fragmentos o formatos de anticuerpos diferentes.

En algunas modalidades, un paTCE dirigido a PSMA comprende una primera porción que es un VHH que se une a PSMA y una segunda porción que es un scFv que se une a CD3. Una o más (p. ej., dos) máscaras polipeptídicas no estructuradas están unidas al núcleo. En algunas modalidades, estas máscaras de polipéptidos no estructurados reducen estéricamente la participación del objetivo del tumor y/o CD3, y también extienden la semivida de la proteína. En algunas modalidades, las máscaras de polipéptidos no estructurados son polipéptidos no naturales (ELNN) de longitud extendida.

En algunas modalidades, las propiedades de los ELNN también minimizan el potencial de inmunogenicidad, ya que su falta de estructuras terciarias estables desfavorece la unión de anticuerpos y la ausencia de residuos hidrofóbicos, aromáticos y cargados positivamente que sirven como residuos de anclaje para el péptido MHC II. la unión reduce el potencial de epítopos de células T.

En algunas modalidades, los sitios de escisión de proteasa en la base de ELNN o ELNN permiten la activación proteolítica del paTCE en el microambiente tumoral, desencadenando TCE más pequeños y altamente potentes que son capaces de redirigir células T citotóxicas para matar células tumorales que expresan el objetivo. En algunas modalidades, en tejidos sanos, donde la actividad de la proteasa está estrictamente regulada, los paTCE permanecen predominantemente inactivos, ampliando así el índice terapéutico en comparación con los TCE desenmascarados.

En algunas modalidades, además de la activación localizada, la semivida corta de la forma de TCE desenmascarado amplía aún más el índice terapéutico al tiempo que

proporciona la potencia de la inmunidad de las células T para mejorar la erradicación de tumores sólidos. En algunas modalidades, los sitios de liberación utilizados en los paTCE se pueden escindir en una amplia gama de tumores mediante proteasas que están involucradas colectivamente en cada característica del cáncer (crecimiento; supervivencia y muerte; angiogénesis; invasión y metástasis; inflamación; y evasión inmune). Por lo tanto, la actividad TCE de los paTCE se localiza en los tumores aprovechando la actividad proteasa mejorada que está regulada positivamente en todas las etapas del cáncer y el desarrollo del tumor, pero que está estrechamente regulada en los tejidos sanos.

Terminología

Como se emplean en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a menos que se especifique lo contrario.

Como se emplean en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una”, “uno”, “el” y “la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, incluidas mezclas de las mismas, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Además, cuando se utilice “y/o” en el presente documento, se debe entender como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por lo tanto, se pretende que el término “y/o” utilizado en una frase tal como “A y/o B” incluya “A y B”, “A o B”, “A” (solo) y “B” (solo). Asimismo, se pretende que el término “y/o” como se emplea en una frase tal como “A, B y/o C” abarque cada uno de los siguientes aspectos: “A,

B y C”; “A, B o C”; “A o C”; “A o B”; “B o C”; “A y C”; “A y B”; “B y C”; “A” (solo); “B” (solo); y “C” (solo).

Se entiende que siempre que se describan en el presente documento aspectos con la expresión “que comprende”, también se proporcionan aspectos análogos descritos en términos de “que consiste en” y/o “que consiste esencialmente en”.

Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi. Los títulos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos de la divulgación. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente haciendo referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

El término “aproximadamente” se utiliza en el presente documento para que signifique de manera aproximada, más o menos, alrededor de o en las regiones de. Cuando el término “aproximadamente” se utiliza junto con un rango numérico, modifica ese rango extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término “aproximadamente” puede modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado en una variación de, p. ej., 10 por ciento, hacia arriba o hacia abajo (más alto o más bajo). En algunas modalidades, el término indica una desviación del valor numérico indicado en ±10 %, ±5 %, ±4 %, ±3 %, ±2 %, ±1 %, ±0,9 %, ±0,8 %, ±0,7 %. ±0,6 %, ±0,5 %, ±0,4 %, ±0,3 %, ±0,2 %, ±0,1 %, ±0,05 % o ±0,01 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±10 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±5 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±4 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico

indicado en ±3 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±2 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±1 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±0,9 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±0,8 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±0,7 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±0,6 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±0,5 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±0,4 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±0,3 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±0,1 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±0,05 %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado en ±0,01 %.

Con respecto a los compuestos naturales, el término “aislado” se refiere a un compuesto (es decir, un polipéptido o polinucleótido) que no está en su estado nativo (p. ej., libre en diversos grados de componentes que acompañan naturalmente al compuesto en la naturaleza). No se requiere ningún nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede eliminarse simplemente de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células anfitrionas se consideran aislados para los fines de la divulgación, al igual que los polipéptidos nativos o recombinantes que han sido separados, fraccionados o purificados parcial o sustancialmente mediante cualquier

técnica adecuada. “Aislar” y “aislado” también pueden denotar un grado de separación de una fuente o entorno original, según el contexto.

El término “polipéptido” se refiere a cualquier polímero de dos o más aminoácidos. Así, los términos péptido, dipéptido, tripéptido, oligopéptido, proteína, cadena de aminoácidos o cualquier otro término utilizado para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de “polipéptido”. El término “polipéptido” también abarca un polímero de aminoácidos que ha sido modificado (p. ej., mediante modificación postraduccional), por ejemplo, mediante formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación, tal como conjugación con un componente marcaje. Dependiendo del contexto, el término “polipéptido” también se puede utilizar para referirse a una proteína que comprende dos o más polímeros de dos o más aminoácidos.

Una “célula anfitriona” incluye una célula individual (p. ej., en cultivo) que comprende un polinucleótido exógeno. Las células anfitrionas pueden incluir progenie de una única célula anfitriona. Es posible que la progenie no sea necesariamente completamente idéntica (en morfología o en genómica del complemento total de ADN) a la célula parental original debido a variaciones que se producen de forma natural o por modificación genética.

Un polipéptido o proteína de “fusión” o “quiméricos” comprenden una primera porción polipeptídica conectada a una segunda porción polipeptídica con la que no está conectada naturalmente en la naturaleza. En algunas modalidades, las porciones pueden existir normalmente en proteínas separadas y conjuntarse en el polipéptido de fusión; normalmente pueden existir en la misma proteína, pero están colocados en una nueva disposición en el polipéptido de fusión; o las porciones se

pueden conjuntar de diferentes fuentes. En algunas modalidades, una proteína quimérica o de fusión comprende dos o más radicales que no se encuentran en la naturaleza (p. ej., son creadas, diseñadas o generadas de otro modo por seres humanos, por ejemplo, como dominios de unión, máscaras, conectores, códigos de barras y otros polipéptidos proporcionados en el presente documento). Se puede crear una proteína quimérica, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante expresión recombinante (p. ej., que comprende crear y traducir un polinucleótido en el que las regiones peptídicas están codificadas en la relación deseada).

"Conjugado", "conectado", "fusionado" y "fusión" se pueden utilizar indistintamente, según el contexto. Estos términos pueden referirse a la unión covalente de dos elementos o componentes químicos más (p. ej., polipéptidos), por cualquier medio, incluida la conjugación química o medios recombinantes.

Como se conoce en la técnica, la "identidad de secuencia" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. De manera similar, la "identidad de secuencia" entre dos polinucleótidos se determina comparando la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido con la secuencia de un segundo polinucleótido. Se pretende que los términos "% idéntico", "% de identidad" o términos similares se refieran, en particular, al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos (según corresponda) que son idénticos en un alineamiento óptimo entre las secuencias que se vayan a comparar. Dicho porcentaje puede ser en el presente documento estadístico, y las diferencias entre las dos secuencias pueden estar, aunque no necesariamente, distribuidas aleatoriamente sobre toda la longitud de las secuencias que se vayan a comparar. Las comparaciones de dos secuencias normalmente se llevan a cabo comparando las secuencias, después de un alineamiento óptimo, con respecto a un segmento o

"ventana de comparación", para identificar regiones locales de secuencias correspondientes. Por ejemplo, el alineamiento óptimo para una comparación se puede llevar a cabo manualmente o con la ayuda del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, Ads App. Math. 2, 482, con la ayuda del algoritmo de homología local de Neddleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443, con la ayuda del algoritmo de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2444, o con la ayuda de programas informáticos que utilizan los algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.). En algunas modalidades, el porcentaje de identidad de dos secuencias se determina utilizando el algoritmo BLASTN o BLASTP, como está disponible en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos (p. ej., en blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK _LOC=align2seq). En algunas modalidades, los parámetros del algoritmo utilizados para el algoritmo BLASTN en el sitio web del NCBI incluyen: (i) Umbral esperado establecido en 10; (ii) Tamaño de palabra establecido en 28; (iii) Coincidencias máximas en un rango de consulta establecido en 0; (iv) Puntuaciones de Coincidencia/No Coincidencia establecidas en 1, -2; (v) Costes de espacio establecidos en Lineal; y (vi) utilizándose el filtro para regiones de baja complejidad. En algunas modalidades, los parámetros del algoritmo utilizados para el algoritmo BLASTP en el sitio web del NCBI incluyen: (i) Umbral esperado establecido en 10; (ii) Tamaño de palabra establecido en 3; (iii) Coincidencias máximas en un rango de consulta establecido en 0; (iv) Matriz establecida en BLOSUM62; (v) Costes de espacio establecidos en Existencia: 11 Ampliación: 1; y (vi) ajuste condicional de la

matriz de puntuación composicional. Cuando se analiza en el presente documento, se puede determinar si cualquier polipéptido particular es al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % idéntico a otro polipéptido utilizando métodos y programas informáticos/soporte lógico conocidos en la técnica tales como, pero sin limitarse a, el programa BESTFIT (Wisconsin Secuencia Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se utiliza BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, idéntica en 95 % a una secuencia de referencia según la presente divulgación, los parámetros se establecen, por supuesto, de manera que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud completa de la secuencia polipeptídica de referencia y que se permitan espacios en la homología de hasta 5 % del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Como se emplean en el presente documento, los términos “polipéptido máscara”, “máscara” y “radical de enmascaramiento” se refieren a un polipéptido que es capaz de reducir la unión de un dominio de unión a antígeno (p. ej., un anticuerpo) al antígeno diana en el contexto de una proteína de fusión (tal como un polipéptido quimérico) proporcionada en el presente documento. Los polipéptidos máscara ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, los polipéptidos ELNN descritos en el presente documento. Los polipéptidos máscara adicionales incluyen albúmina, polipéptidos que consisten en prolina, serina y alanina, dominios de bobina en espiral, dominios de unión a albúmina, dominios Fc y dominios de unión con

especificidad para regiones conservadas de un dominio variable de anticuerpo. Los polipéptidos máscara son descritos con más detalle por Lucchi et al. (ACS Cent Sci. 26 de mayo de 2021; 7(5): 724–738).

Como se emplean en el presente documento, los términos “polipéptidos ELNN” y “ELNN” son sinónimos y se refieren a polipéptidos de longitud extendida que comprenden secuencias sustancialmente no repetitivas y de origen no natural (*p. ej.*, motivos polipeptídicos) que están compuestos principalmente de pequeños aminoácidos hidrófilos, teniendo la secuencia un grado bajo o ninguna estructura secundaria o terciaria en condiciones fisiológicas. Los polipéptidos ELNN incluyen polipéptidos hidrófilos no estructurados que comprenden motivos repetidos de 6 aminoácidos naturales (G, A, P, E, S y/o T). En algunas modalidades, un polipéptido ELNN comprende múltiples motivos de 6 aminoácidos naturales (G, A, P, E, S, T), en donde los motivos son los mismos o comprenden una combinación de diferentes motivos. En algunas modalidades, los polipéptidos ELNN pueden conferir ciertas propiedades farmacocinéticas, fisicoquímicas y farmacéuticas deseables cuando se conectan a proteínas, incluidos los acopladores de células T como se divulga en el presente documento. Tales propiedades deseables pueden incluir, pero sin limitarse a, mejores parámetros farmacocinéticos y características de solubilidad, así como un índice terapéutico mejorado. Los polipéptidos ELNN son conocidos en la técnica, y las descripciones no limitantes relacionadas con, los polipéptidos ELNN conocidos como polipéptidos XTEN® y sus ejemplos están disponibles en Schellenberger et al., (2009) *Nat Biotechnol* 27(12):1186-90; Brandl et al., (2020) *Journal de Controlled Release* 327:186-197; y Radon et al., (2021) *Advanced Functional Materials* 31, 2101633 (páginas 1-33), cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia.

En algunas modalidades, la repetitividad de una secuencia de ELNN se refiere a la repetitividad de trímeros y se puede medir mediante programas informáticos o algoritmos o mediante otros medios conocidos en la técnica. En algunas modalidades, la repetitividad de trímeros de un ELNN se puede evaluar determinando el número de apariciones de las secuencias de trímeros solapantes dentro del polipéptido. Por ejemplo, un polipéptido de 200 restos de aminoácidos tiene 198 secuencias solapantes de 3 aminoácidos (trímeros), pero el número de secuencias únicas de trímeros dependerá de la cantidad de repetitividad dentro de la secuencia. En algunas modalidades, se puede generar la puntuación (en lo sucesivo “puntuación de subsecuencia”) que refleja el grado de repetitividad de los trímeros en la secuencia polipeptídica general. En este contexto, “puntuación de subsecuencia” significa la suma de apariciones de cada marco trimérico único en una secuencia de 200 aminoácidos consecutiva del polipéptido dividida por el número absoluto de subsecuencias triméricas únicas dentro de la secuencia de 200 aminoácidos. En el Ejemplo 73 de la Publicación de Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 2010/091122 A1, que se incorpora como referencia en su totalidad se presentan ejemplos de tales puntuaciones de subsecuencias derivadas de los primeros 200 aminoácidos de polipéptidos repetitivos y no repetitivos.

En algunas modalidades, y en el contexto de los ELNN, una “secuencia sustancialmente no repetitiva” se refiere a una secuencia de ELNN, en donde (1) hay pocos o ningún caso de cuatro aminoácidos idénticos seguidos en la secuencia de ELNN y en donde (2) el ELNN tiene una puntuación de subsecuencia (definida en el párrafo anterior en el presente documento) de 12, o 10 o menos o no tiene un patrón de orden, del extremo N-terminal al C-terminal, de los motivos de secuencia que constituyen la secuencia polipeptídica.

Un “vector” es una molécula de ácido nucleico que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada dentro y/o entre células anfitrionas. En algunas modalidades, un vector se autorreplica en un anfitrión apropiado. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula, replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriores. Un “vector de expresión” es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula anfitriona apropiada, se puede utilizar para la transcripción de ARNm que se traduce a uno o más polipéptidos. En algunas modalidades, un “sistema de expresión” es una célula anfitriona adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado. Los términos “tratamiento” o “tratar” y “mejorar” se pueden utilizar indistintamente en el presente documento. Estos términos se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados que incluyen, pero sin limitarse a, un beneficio terapéutico. Por “beneficio terapéutico” se entiende la erradicación o mejora del trastorno subyacente que se está tratando. En algunas modalidades, se logra un beneficio terapéutico con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con la enfermedad subyacente de modo que se observe una mejora en el sujeto, a pesar de que el sujeto todavía pueda estar afectado por el trastorno subyacente. En algunas modalidades, un beneficio terapéutico comprende ralentizar o detener el crecimiento de uno o más tumores. En algunas modalidades, un beneficio terapéutico comprende reducir el tamaño de uno o más tumores. En algunas modalidades, un beneficio terapéutico comprende erradicar uno o más

tumores de un sujeto. En algunas modalidades, un beneficio terapéutico comprende efectuar la muerte de células cancerosas.

Como se emplea en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un agente biológicamente activo (tal como una proteína de fusión proporcionada en el presente documento, p. ej., como parte de una composición farmacéutica), que es capaz de tener cualquier valor detectable, efecto beneficioso sobre cualquier síntoma, aspecto, parámetro medido o características de un estado patológico o afección cuando se administra en una dosis o en dosis repetidas a un sujeto. No es necesario que tal efecto sea absoluto para ser beneficioso. La afección patológica puede referirse a un trastorno o una enfermedad, por ejemplo, cáncer o un síntoma de cáncer.

Dominios de unión a antígeno, secuencias de escisión, fragmentos de códigos de barras y polipéptidos de fusión

La presente divulgación proporciona, entre otros, anticuerpos anti-PSMA nuevos y útiles, anticuerpos anti-CD3 nuevos y útiles, secuencias de escisión, fragmentos de códigos de barras y proteínas de fusión que comprenden los mismos. En el presente documento se incluyen polipéptidos de fusión que comprenden (i) uno o más polipéptidos máscara (tales como ELNN), (ii) un anticuerpo biespecífico (BsAb, p. ej., un TCE) conectado a uno o varios polipéptidos máscara, y (iii) uno o más segmentos de liberación (RS) escindibles por proteasa, en donde un RS está colocado entre los uno o varios polipéptidos máscara y el BsAb.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PSMA proporcionados en el presente documento incluyen un dominio VHH que comprende las CDR de un dominio VHH que comprende la secuencia:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAM
SWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYG
RTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD3 proporcionados en el presente documento comprenden un dominio VH que comprende las CDR de un dominio VH que comprende la secuencia:

EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIR
TKRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFG
NSYVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311)

y/o un dominio VL que comprende las CDR de un dominio VL que comprende la secuencia:

ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT
NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTK
LTVL (SEQ ID NO: 361).

También se proporcionan BsAb que comprenden, p. ej., anticuerpos anti-PSMA y/o anticuerpos anti-CD3 divulgados en el presente documento. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos comprenden una región VHH anti-PSMA divulgada en el presente documento. En algunas modalidades, los BsAb comprenden las regiones VH y VL de un anticuerpo anti-CD3 divulgado en el presente documento. En algunas modalidades, los BsAb comprenden una región VHH anti-PSMA y un scFV anti-CD3 que comprende un par VH y VL divulgado en el presente documento. En algunas modalidades, los BsAb son TCE.

En algunas modalidades, el polipéptido de fusión comprende un primer ELNN (tal como un ELNN descrito en el presente documento). En algunas modalidades, el polipéptido comprende adicionalmente un segundo ELNN (tal como un ELNN

descrito en el presente documento). En algunas modalidades, el polipéptido comprende un ELNN en o cerca de su extremo N-terminal (un “ELNN N-terminal”). En algunas modalidades, el polipéptido comprende un ELNN en o cerca de su extremo C-terminal (un “ELNN C-terminal”). En algunas modalidades, el polipéptido comprende tanto un ELNN N-terminal como un ELNN C-terminal.

En algunas modalidades, un polipéptido de fusión comprende un BsAb y un primer ELNN está anclado al extremo N-terminal del BsAb mediante un primer RS y un segundo ELNN está anclado al extremo C-terminal del BsAb mediante un segundo RS. En algunas modalidades, cada RS se puede escindir mediante una proteasa mencionada en el presente documento. En algunas modalidades, cada RS comprende una secuencia de RS divulgada en el presente documento. En algunas modalidades, el polipéptido de fusión es un paTCE.

En el presente documento se incluyen secuencias polipeptídicas que se pueden utilizar, p. ej., para conectar un radical polipeptídico a otro dentro de una proteína de fusión. Por ejemplo, se proporcionan conectores útiles que son escindidos por múltiples proteasas, pero no por legumaína. En algunas modalidades, tales conectores se pueden utilizar fuera del contexto de anticuerpos como los descritos en el presente documento.

En algunas modalidades, un polipéptido de fusión (p. ej., uno o más ELNN de un paTCE y/u otra porción de un polipéptido de fusión tal como una secuencia conectora o espaciadora) puede comprender uno o más fragmentos de códigos de barras (p. ej., como se describe en el presente documento) liberables (p. ej., configurados para ser liberados) del polipéptido de fusión tras la escisión o digestión del polipéptido de fusión (p. ej., un paTCE) mediante una proteasa. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa que no es de mamífero. En algunas

modalidades, cada fragmento de código de barras tiene una secuencia y peso molecular diferentes de los de todos los demás fragmentos peptídicos (incluidos todos los demás fragmentos de códigos de barras si están presentes) que se pueden liberar del polipéptido tras la digestión completa del polipéptido por la proteasa, haciéndolo así único y haciendo así su presencia detectable mediante técnicas tales como la espectrometría de masas.

Polipéptidos recombinantes extendidos (ELNN)

Longitud de cadena y composición de aminoácidos

En algunas modalidades, un ELNN comprende al menos 100, o al menos 150 aminoácidos. En algunas modalidades, un ELNN tiene de 100 a 3.000, o de 150 a 3.000 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un ELNN tiene de 100 a 1.000, o de 150 a 1.000 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un ELNN tiene al menos (aproximadamente) 100, al menos (aproximadamente) 150, al menos (aproximadamente) 200, al menos (aproximadamente) 250, al menos (aproximadamente) 300, al menos (aproximadamente) 350, al menos (aproximadamente) 400, al menos (aproximadamente) 450, al menos (aproximadamente) 500, al menos (aproximadamente) 550, al menos (aproximadamente) 600, al menos (aproximadamente) 650, al menos (aproximadamente) 700, al menos (aproximadamente) 750, al menos (aproximadamente) 800, al menos (aproximadamente) 850, al menos (aproximadamente) 900, al menos (aproximadamente) 950, al menos (aproximadamente) 1.000, al menos (aproximadamente) 1.100, al menos (aproximadamente) 1.200, al menos (aproximadamente) 1.300, al menos

(aproximadamente) 1.400, al menos (aproximadamente) 1.500, al menos (aproximadamente) 1.600, al menos (aproximadamente) 1.700, al menos (aproximadamente) 1.800, al menos (aproximadamente) 1.900, o al menos (aproximadamente) 2.000 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un ELNN tiene a lo sumo (aproximadamente) 100, a lo sumo (aproximadamente) 150, a lo sumo (aproximadamente) 200, a lo sumo (aproximadamente) 250, a lo sumo (aproximadamente) 300, a lo sumo (aproximadamente) 350, a lo sumo (aproximadamente) 400, a lo sumo (aproximadamente) 450, a lo sumo (aproximadamente) 500, a lo sumo (aproximadamente) 550, a lo sumo (aproximadamente) 600, a lo sumo (aproximadamente) 650, a lo sumo (aproximadamente) 700, a lo sumo (aproximadamente) 750, a lo sumo (aproximadamente) 800, a lo sumo (aproximadamente) 850, a lo sumo (aproximadamente) 900, a lo sumo (aproximadamente) 950, a lo sumo (aproximadamente) 1.000, a lo sumo (aproximadamente) 1.100, a lo sumo (aproximadamente) 1.200, a lo sumo (aproximadamente) 1.300, a lo sumo (aproximadamente) 1.400, a lo sumo (aproximadamente) 1.500, a lo sumo (aproximadamente) 1.600, a lo sumo (aproximadamente) 1.700, a lo sumo (aproximadamente) 1.800, a lo sumo (aproximadamente) 1.900, o a lo sumo (aproximadamente) 2.000 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un ELNN tiene (aproximadamente) 100, (aproximadamente) 150, (aproximadamente) 200, (aproximadamente) 250, (aproximadamente) 300, (aproximadamente) 350, (aproximadamente) 400, (aproximadamente) 450, (aproximadamente) 500, (aproximadamente) 550, (aproximadamente) 600, (aproximadamente) 650, (aproximadamente) 700, (aproximadamente) 750, (aproximadamente) 800, (aproximadamente) 850, (aproximadamente) 900, (aproximadamente) 950,

(aproximadamente) 1.000, (aproximadamente) 1.100, (aproximadamente) 1.200, (aproximadamente) 1.300, (aproximadamente) 1.400, (aproximadamente) 1.500, (aproximadamente) 1.600, (aproximadamente) 1.700, (aproximadamente) 1.800, (aproximadamente) 1.900, o (aproximadamente) 2.000 aminoácidos de longitud, o un rango entre dos cualesquiera de los anteriores. En algunas modalidades, al menos 90 % de los restos de aminoácidos del ELNN son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P). En algunas modalidades, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de los restos de aminoácidos del ELNN son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P). En algunas modalidades, un ELNN comprende al menos 3 tipos diferentes de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P. En algunas modalidades, un ELNN comprende al menos 4 tipos diferentes de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P. En algunas modalidades, un ELNN comprende al menos 5 tipos diferentes de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P. En algunas modalidades, un ELNN consiste en aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P. En algunas modalidades, un ELNN comprende los aminoácidos G, A, S, T, E, o P. En algunas modalidades, un ELNN (p. ej., ELNN1, ELNN2, etc.) se caracteriza porque: (i) comprende al menos 100, o al menos 150 aminoácidos; (ii) al menos 90 % de los restos de aminoácidos del ELNN son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P); y (iii) comprende al menos 4 tipos diferentes de los aminoácidos de G, A, S, T, E, o P. Como se emplea en el presente documento, el término “glutamato” es un sinónimo de “ácido glutámico”, y se refiere al resto de ácido glutámico esté o no el carboxilo de la cadena lateral desprotonado. En algunas modalidades, el polipéptido de fusión que contiene ELNN comprende un primer ELNN

y un segundo ELNN. En algunas modalidades, la suma del número total de aminoácidos en el primer ELNN y el número total de aminoácidos en el segundo ELNN es al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 500, al menos 600, al menos 700, o al menos 800 aminoácidos.

Motivo de secuencia no solapante

En algunas modalidades, el ELNN comprende, o está formado a partir de, una pluralidad de motivos de secuencia no solapantes. En algunas modalidades, al menos uno de los motivos de secuencia no solapantes es recurrente (o se repite al menos dos veces en el ELNN). En algunas modalidades, el ELNN comprende al menos otro motivo de secuencia no solapante que no es recurrente (o se encuentra solo una vez dentro del ELNN). En algunas modalidades, la pluralidad de motivos de secuencia no solapantes comprende (a) un conjunto de motivos de secuencia no solapantes (recurrentes), en donde cada motivo de secuencia no solapante del conjunto de motivos de secuencia no solapantes se repite al menos dos veces en el ELNN; y (b) un motivo de secuencia no solapante (no recurrente) que aparece (o se encuentra) solo una vez dentro del ELNN. En algunas modalidades, cada motivo de secuencia no solapante tiene de 9 a 14 (o de 10 a 14, o de 11 a 13) aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, cada motivo de secuencia no solapante tiene una longitud de 12 aminoácidos. En algunas modalidades, la pluralidad de motivos de secuencia no solapantes comprende un conjunto de motivos de secuencia no solapantes (recurrentes), en donde cada motivo de secuencia no solapante del conjunto de motivos de secuencia no solapantes (1) se repite al menos dos veces en el ELNN; y (2) tiene entre 9 y 14 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el conjunto de motivos de secuencia no solapantes (recurrentes) comprende motivos de

secuencia dodecaméricos identificados por SEQ ID NO: 179-200 y 1715-1722 en la Tabla 1. En algunas modalidades, el conjunto de motivos de secuencia no solapantes (recurrentes) comprende motivos de secuencia dodecaméricos identificados en el presente documento por SEQ ID NO: 186-189 en la Tabla 1. En algunas modalidades, el conjunto de motivos de secuencia no solapantes (recurrentes) comprende al menos dos, al menos tres o los cuatro motivos de secuencia dodecaméricos de SEQ ID NO: 186-189 en la Tabla 1. En algunas modalidades, un ELNN comprende adicionalmente una secuencia distinta de un motivo de secuencia dodecamérico que se muestra en la Tabla 1. En algunas modalidades, un ELNN comprende una secuencia que no está en la Tabla 1, tal como ASSATPESGP, GSGPGTSESATP o GTSESATP. En algunas modalidades, un ELNN comprende una secuencia que no está en la Tabla 1, tal como ATPESGP, GTSPSATPESGP o GTSESAGEPEA. En algunas modalidades, un ELNN comprende una secuencia de código de barras.

Tabla 1. Motivos de secuencia dodecaméricos ilustrativos para la construcción de los ELNN

Familia de Motivos*	**Secuencia de Aminoácidos**	**SEQ ID NO.**
AD	GESPGGSSGSES	**182**
AD	GSEGSSGPGESS	**183**
AD	GSSESGSSEGGP	**184**
AD	GSGGEPSESGSS	**185**
AE, AM	GSPAGSPTSTEE	**186**
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP	**187**
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP	**188**
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP	**189**
AF, AM	GSTSESPSGTAP	**190**
AF, AM	GTSTPESGSASP	**191**
AF, AM	GTSPSGESSTAP	**192**
AF, AM	GSTSSTAESPGP	**193**
AG, AM	GTPGSGTASSSP	**194**

Familia de Motivos*	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO.
AG, AM	GSSTPSGATGSP	**195**
AG, AM	GSSPSASTGTGP	**196**
AG, AM	GASPGTSSTGSP	**197**
AQ	GEPAGSPTSTSE	**198**
AQ	GTGEPSSTPASE	**199**
AQ	GSGPSTESAPTE	**200**
AQ	GSETPSGPSETA	**179**
AQ	GPSETSTSEPGA	**180**
AQ	GSPSEPTEGTSA	**181**
BC	GSGASEPTSTEP	**1715**
BC	GSEPATSGTEPS	**1716**
BC	GTSEPSTSEPGA	**1717**
BC	GTSTEPSEPGSA	**1718**
BD	GSTAGSETSTEA	**1719**
BD	GSETATSGSETA	**1720**
BD	GTSESATSESGA	**1721**
BD	GTSTEASEGSAS	**1722**

*Denota secuencias de motivos individuales que, cuando se utilizan juntas en varias permutaciones, dan como resultado una “secuencia de familia”

Confirmación de polipéptidos no estructurados

En diversas modalidades, un componente ELNN (o los componentes ELNN) de una proteína de fusión tiene una conformación no estructurada en condiciones fisiológicas, independientemente de la longitud (p. ej., longitud extendida) del polímero. Por ejemplo, el ELNN se caracteriza por una gran libertad conformacional del esqueleto peptídico. En algunas modalidades, el ELNN se caracteriza por una falta de interacciones de largo alcance según se determina por RMN. En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona ELNN que, en condiciones fisiológicas, se asemejan a la estructura de secuencias desnaturalizadas desprovistas en gran medida de estructura secundaria. En algunas modalidades, los ELNN pueden estar sustancialmente desprovistos de estructura secundaria en condiciones fisiológicas. “Desprovistas en gran medida”, como se emplea en este contexto, significa que menos

de 50 % de los restos de aminoácidos de ELNN del ELNN contribuye a la estructura secundaria medida o determinada por los medios descritos en el presente documento. “Sustancialmente desprovistos”, como se emplea en este contexto, significa que al menos aproximadamente 60 %, o aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 %, o al menos aproximadamente 99 % de los restos de aminoácido de ELNN de la secuencia de ELNN no contribuyen a la estructura secundaria, medida o determinada por los medios descritos en el presente documento.

Se han establecido una variedad de métodos en la técnica para discernir la presencia o ausencia de estructuras secundarias y terciarias en un polipéptido determinado. En algunas modalidades, la estructura secundaria de ELNN se puede medir espectrofotométricamente, p. ej., mediante espectroscopia de dicroísmo circular en la región espectral “UV lejano” (190-250 nm). Los elementos estructurales secundarios, tales como la hélice alfa y la lámina beta, dan lugar a una forma y magnitud características de los espectros de CD. La estructura secundaria también se puede predecir para una secuencia polipeptídica mediante ciertos programas informáticos o algoritmos, tales como el algoritmo de Chou-Fasman (Chou, P. Y., et al. (1974) *Biochemistry*, 13: 222-45) y el algoritmo de Garnier-Osguthorpe-Robson (“GOR”) (Garnier J, Gibrat JF, Robson B. (1996), método GOR para predecir la estructura secundaria de proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos. Methods Enzymol 266:540-553) bien conocidos, como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 20030228309A1 (cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia). Para una secuencia dada, los algoritmos pueden predecir si existe alguna o ninguna estructura secundaria, expresada como el total y/o

porcentaje de restos de la secuencia que forman, por ejemplo, hélices alfa o láminas beta o el porcentaje de restos de la secuencia que se predice que dará como resultado la formación de espirales aleatorias (que carecen de estructura secundaria).

En algunas modalidades, los ELNN utilizados en una composición de proteína de fusión pueden tener un porcentaje de hélice alfa que varía de 0 % a menos de aproximadamente 5 % según se determina mediante un algoritmo de Chou-Fasman. En algunas modalidades, los ELNN de las composiciones de proteínas de fusión pueden tener un porcentaje de lámina beta que oscila entre 0 % y menos de aproximadamente 5 % según se determina mediante un algoritmo de Chou-Fasman. En algunas modalidades, los ELNN de las composiciones de proteínas de fusión pueden tener un porcentaje de hélice alfa que oscila entre 0 % y menos de aproximadamente 5 % y un porcentaje de lámina beta que oscila entre 0 % y menos de aproximadamente 5 % según se determina por un algoritmo de Chou-Fasman. En algunas modalidades, los ELNN de las composiciones de proteínas de fusión tendrán un porcentaje de hélice alfa inferior a aproximadamente 2 % y un porcentaje de lámina beta inferior a aproximadamente 2 %. En algunas modalidades, los ELNN de las composiciones de proteínas de fusión pueden tener un alto grado de porcentaje de espiral aleatoria, según se determina por un algoritmo GOR. En algunas modalidades, un ELNN puede tener al menos aproximadamente 80 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 90 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 91 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 92 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 93 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 90 %. aproximadamente 94 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 95 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 96 %, más preferiblemente al

menos aproximadamente 97 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 98 % y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99 % de espiral aleatoria, según se determina por un algoritmo GOR.

Carga neta

En algunas modalidades, los polipéptidos ELNN pueden tener una característica no estructurada impartida mediante la incorporación de restos de aminoácidos con una carga neta y/o la reducción de la proporción de aminoácidos hidrófobos en la secuencia de ELNN. La carga neta general y la densidad de carga neta se pueden controlar, p. ej., modificando el contenido de aminoácidos cargados en los ELNN. En algunas modalidades, la densidad de carga neta del ELNN de las composiciones puede estar por encima de +0,1 o por debajo de -0,1 cargas/resto. En algunas modalidades, la carga neta de un ELNN puede ser aproximadamente 0 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 % o aproximadamente 20 % o más.

Dado que la mayoría de los tejidos y superficies en un ser humano o animal tienen una carga negativa neta, los ELNN se pueden diseñar opcionalmente para tener una carga negativa neta para minimizar las interacciones no específicas entre las composiciones que contienen ELNN y diversas superficies, tales como vasos sanguíneos, tejidos sanos o varios receptores. Sin vincularse a una teoría particular,

un ELNN puede adoptar conformaciones abiertas debido a la repulsión electrostática entre aminoácidos individuales del polipéptido ELNN que individualmente portan una carga negativa neta alta y que se distribuyen a lo largo de la secuencia del polipéptido ELNN. Tal distribución de carga negativa neta en las longitudes de secuencia extendidas de ELNN puede conducir a una conformación no estructurada que, a su vez, puede dar como resultado un aumento efectivo en el radio hidrodinámico. Por consiguiente, En algunas modalidades los ELNN contienen ácido glutámico de manera que el ácido glutámico está en aproximadamente 8, 10, 15, 20, 25 o incluso aproximadamente 30 % de los aminoácidos en las secuencias. Los ELNN de las composiciones de la presente divulgación generalmente tienen un contenido bajo o nulo de aminoácidos cargados positivamente. En algunas modalidades, el ELNN puede tener menos de aproximadamente 10 % de restos de aminoácidos con una carga positiva, o menos de aproximadamente 7 %, o menos de aproximadamente 5 %, o menos de aproximadamente 2 % de restos de aminoácidos con una carga positiva. Sin embargo, la presente divulgación contempla polipéptidos en los que se puede incorporar un número limitado de aminoácidos con una carga positiva, tal como lisina, en un ELNN, p. ej., para permitir la conjugación entre la amina épsilon de la lisina y un grupo reactivo en un péptido, un puente conector o un grupo reactivo en un fármaco o molécula pequeña que se conjugará con la cadena principal del ELNN.

En algunas modalidades, un ELNN puede comprender restos cargados separados por otros restos tales como serina o glicina, lo que puede conducir a una mejor expresión o comportamiento de purificación. Según la carga neta, los ELNN de las composiciones en cuestión pueden tener un punto isoeléctrico (pI) de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 o incluso 6,5. En algunas modalidades, el ELNN

tendrá un punto isoeléctrico entre 1,5 y 4,5. En algunas modalidades, un ELNN incorporado a una proteína de fusión de paTCE porta una carga negativa neta en condiciones fisiológicas que contribuye a la conformación no estructurada y a la menor unión del componente ELNN a proteínas y tejidos de mamíferos.

Puesto que los aminoácidos hidrófobos pueden conferir estructura a un polipéptido, En algunas modalidades el contenido de aminoácidos hidrófobos en el ELNN es inferior a 5 %, o inferior a 2 %, o inferior a 1 % del contenido de aminoácidos hidrófobos. En algunas modalidades, un ELNN no tiene aminoácidos hidrófobos. En algunas modalidades, el contenido de aminoácidos de metionina y triptófano en el componente ELNN de una proteína de fusión de paTCE es inferior a 5 %, o inferior a 2 %, y lo más preferentemente inferior a 1 %. En algunas modalidades, el ELNN tiene una secuencia que tiene menos de 10 % de restos de aminoácidos con una carga positiva, o menos de aproximadamente 7 %, o menos de aproximadamente 5 %, o menos de aproximadamente 2 % de restos de aminoácidos con una carga positiva, la suma de los restos de metionina y triptófano será inferior a 2 %, y la suma de los restos de asparragina y glutamina será inferior a 10 % de la secuencia de ELNN total. En algunas modalidades, el ELNN no tiene restos de metionina o triptófano.

Mayor radio hidrodinámico

En algunas modalidades, el ELNN puede tener un radio hidrodinámico alto, lo que confiere un mayor Peso Molecular Aparente correspondiente a la proteína de fusión de paTCE que incorpora el ELNN. La conexión de ELNN a secuencias de BsAb (p. ej., TCE) puede dar como resultado composiciones de paTCE que pueden tener mayores radios hidrodinámicos, mayor Peso Molecular Aparente y mayor Factor de

Peso Molecular Aparente en comparación con los BsAb (p. ej., TCE) no conectados a un ELNN. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas en las que se desea una semivida prolongada, se incorporan uno o más ELNN con un radio hidrodinámico alto a una proteína de fusión que comprende un BsAb (p. ej., un TCE) para ampliar eficazmente el radio hidrodinámico de la proteína de fusión más allá del tamaño de poro glomerular de aproximadamente 3-5 nm (correspondiente a un Peso Molecular Aparente de aproximadamente 70 kDa) (Caliceti. 2003. Pharmacokinetic and biodistribution properties de poly(etilenglicol)-protein conjugates. Adv. Drug Deliv. Rev. 55:1261-1277), lo que da como resultado una reducción del aclaramiento renal de las proteínas circulantes. En algunas modalidades, el radio hidrodinámico de una proteína está determinado por su peso molecular, así como por su estructura, incluyendo forma y compacidad. Sin vincularse a una teoría particular, el ELNN puede adoptar conformaciones abiertas debido a la repulsión electrostática entre cargas individuales del péptido o la flexibilidad inherente conferida por los aminoácidos particulares en la secuencia que carecen de potencial para conferir una estructura secundaria. En algunas modalidades, la conformación abierta, extendida y no estructurada del polipéptido ELNN tiene un radio hidrodinámico proporcional mayor en comparación con polipéptidos de una longitud de secuencia y/o peso molecular comparables que tienen estructura secundaria y/o terciaria, tales como proteínas globulares típicas. Los métodos para determinar el radio hidrodinámico son bien conocidos en la técnica, tal como por ejemplo mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), como se describe en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.406.632 y 7.294.513. En algunas modalidades, la adición de longitudes crecientes de ELNN da como resultado aumentos proporcionales en los parámetros de radio hidrodinámico, Peso Molecular Aparente y Factor de Peso Molecular

Aparente, lo que permite adaptar paTCE a los Pesos Moleculares Aparentes de corte o radios hidrodinámicos característicos deseados. Por consiguiente, En algunas modalidades, la proteína de fusión de paTCE puede configurarse con un ELNN de modo que la proteína de fusión pueda tener un radio hidrodinámico de al menos aproximadamente 5 nm, o al menos aproximadamente 8 nm, o al menos aproximadamente 10 nm, o 12 nm, o al menos aproximadamente 15 nm. En algunas modalidades, el gran radio hidrodinámico conferido por el ELNN a una proteína de fusión de paTCE puede conducir a una reducción del aclaramiento renal de la proteína de fusión resultante, lo que lleva a un aumento correspondiente en la semivida terminal, un aumento en el tiempo de residencia medio y/o una disminución en la tasa de aclaramiento renal.

En algunas modalidades, un ELNN (o múltiples ELNN, tales como dos ELNN) de una longitud y secuencia elegidas se pueden incorporar selectivamente a un paTCE para crear una proteína de fusión que tendrá, en condiciones fisiológicas, un Peso Molecular Aparente de al menos aproximadamente 150 kDa, o al menos aproximadamente 300 kDa, o al menos aproximadamente 400 kDa, o al menos aproximadamente 500 kDa, o al menos aproximadamente 600 kDa, o al menos aproximadamente 700 kDa, o al menos aproximadamente 800 kDa, o al menos aproximadamente 900 kDa, o al menos aproximadamente 1000 kDa, o al menos aproximadamente 1200 kDa, o al menos aproximadamente 1500 kDa, o al menos aproximadamente 1800 kDa, o al menos aproximadamente 2000 kDa, o al menos aproximadamente 2300 kDa o más. En algunas modalidades, un ELNN (o múltiples ELNN, tales como dos ELNN) de una longitud y secuencia elegidas se puede conectar selectivamente a un BsAb (p. ej., un TCE) para dar como resultado una proteína de fusión de paTCE que tiene, en condiciones fisiológicas, un Factor de Peso Molecular Aparente de al menos 3,

alternativamente de al menos 4, alternativamente de al menos 5, alternativamente de al menos 6, alternativamente de al menos 7, alternativamente de al menos 8, alternativamente de al menos 9, alternativamente de al menos 10, alternativamente de al menos 15, o un Factor de Peso Molecular Aparente de al menos 20 o mayor. En algunas modalidades, la proteína de fusión de paTCE tiene, en condiciones fisiológicas, un factor de Peso Molecular Aparente que es de aproximadamente 4 a aproximadamente 20, o es de aproximadamente 6 a aproximadamente 15, o es de aproximadamente 8 a aproximadamente 12, o es de aproximadamente 9 a aproximadamente 10 con respecto al peso molecular real de la proteína de fusión. En algunas modalidades, el polipéptido de fusión muestra un factor de peso molecular aparente en condiciones fisiológicas que es mayor que aproximadamente 6.

Mayor semivida terminal

En algunas modalidades, un polipéptido de fusión que comprende un ELNN (tal como un paTCE) tiene una semivida terminal que es al menos dos veces más larga, o al menos tres veces más larga, o al menos cuatro veces más larga, o al menos cinco veces más larga, en comparación con un polipéptido biológicamente activo correspondiente que no está conectado al ELNN. En algunas modalidades, el polipéptido (de fusión) tiene una semivida terminal que es al menos dos veces más larga en comparación con el polipéptido biológicamente activo no conectado al ELNN.

En algunas modalidades, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de paTCE a un sujeto que la necesita da como resultado una ganancia en el tiempo de al menos dos veces, o al menos tres veces, o al menos cuatro veces, o al menos cinco veces o más consumido dentro de una ventana

terapéutica para la proteína de fusión en comparación con el BsAb (p. ej., TCE) correspondiente no conectado al ELNN o a los ELNN cuando se administra a una dosis comparable a un sujeto.

En algunas modalidades, un TCE liberado de un paTCE tras la escisión con proteasa comprende uno o más polipéptidos cortos (p. ej., aproximadamente 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10 o menos aminoácidos de longitud) que no tiene aminoácidos distintos de G, A, P, E, S y/o T. Por ejemplo, se podría incorporar un polipéptido corto que no tiene aminoácidos distintos de G, A, P, E, S y/o T a una o más secuencias espaciadoras o conectoras del TCE, y/o una porción de uno o más espaciadores o conectores que permanecen como parte del TCE después de la escisión. En algunas modalidades, un TCE que se libera de un paTCE comprende un GTSESATPES en el lado N-terminal (p. ej., el aminoácido más cercano de la secuencia está dentro de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 posiciones de aminoácido del aminoácido N-terminal o la secuencia incluye el extremo N-terminal) del TCE. En algunas modalidades, un TCE que se libera de un paTCE comprende un GTATPESGPG en el lado C-terminal (p. ej., el aminoácido más cercano de la secuencia está dentro de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 posiciones de aminoácido del aminoácido N-terminal o la secuencia incluye el extremo N-terminal) del TCE. En algunas modalidades, un TCE comprende un conector interno (p. ej., entre una región VL y una región VH de un scFV) que comprende una secuencia polipeptídica sin aminoácidos distintos de G, A, P, E, S y/o T, tal como SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81).

Baja inmunogenicidad

En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona composiciones en las que los ELNN tienen un bajo grado de inmunogenicidad o son sustancialmente

no inmunogénicos. Varios factores pueden contribuir a la baja inmunogenicidad de un ELNN, p. ej., la secuencia sustancialmente no repetitiva, la conformación no estructurada, el alto grado de solubilidad, el bajo grado o falta de autoagregación, el bajo grado o falta de sitios proteolíticos dentro la secuencia, y el bajo grado o falta de epítopos en el ELNN.

Un experto en la técnica entenderá que, en general, los polipéptidos que tienen secuencias cortas de aminoácidos altamente repetitivas (p. ej., en donde una secuencia de 200 aminoácidos de longitud contiene como promedio 20 repeticiones o más de un conjunto limitado de trímeros o tetrámeros) y/o que tienen restos de aminoácidos repetitivos contiguos (p. ej., en donde las secuencias de pentámeros o hexámeros tienen restos de aminoácidos idénticos) tienen una tendencia a agregarse o formar estructuras de orden superior o formar contactos que dan como resultado estructuras cristalinas o pseudocristalinas.

En algunas modalidades, una secuencia de ELNN es sustancialmente no repetitiva, en donde (1) la secuencia de ELNN no tiene tres aminoácidos contiguos que sean tipos de aminoácidos idénticos, a menos que el aminoácido sea serina, en cuyo caso no más de tres de los aminoácidos contiguos pueden ser restos de serina; y en donde (2) el ELNN no contiene secuencias de 3 aminoácidos (trímeros) que aparecen más de 16, más de 14, más de 12 o más de 10 veces dentro de una secuencia de al menos 200 aminoácidos de longitud del ELNN (p. ej., todo el intervalo de un ELNN que tiene al menos una longitud de aminoácidos). Sin vincularse a ninguna teoría científica, tales secuencias sustancialmente no repetitivas tienen menos tendencia a agregarse y, por lo tanto, permiten el diseño de ELNN de secuencia larga con una frecuencia relativamente baja de aminoácidos cargados que probablemente se agregarían si las secuencias o restos de aminoácidos fueran de otro modo más repetitivos.

Los epítopos conformacionales pueden estar formados por regiones de superficies proteicas que están compuestas de múltiples secuencias discontinuas de aminoácidos de un antígeno proteico. Sin vincularse a ninguna teoría científica, el plegamiento preciso de la proteína puede llevar estas secuencias a configuraciones o epítopos espaciales estables y bien definidos que pueden ser reconocidos como "foráneos" por el sistema inmunológico humoral del anfitrión, lo que da como resultado la producción de anticuerpos contra la proteína y/o el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria mediada por células. En el último caso, la respuesta inmunitaria a una proteína en un individuo está fuertemente influenciada por el reconocimiento del epítopo de las células T, que es una función de la especificidad de unión del péptido del alotipo HLA-DR de ese individuo. La interacción de un complejo peptídico de MHC de Clase II con un receptor de células T relacionado en la superficie de la célula T, junto con la unión cruzada de otros correceptores, tales como la molécula CD4, pueden inducir un estado activado dentro de la célula T. La activación puede conducir a la liberación de citocinas que activan adicionalmente otros linfocitos, tales como las células B, para producir anticuerpos o activan las células T asesinas como una respuesta inmunitaria celular completa.

Sin vincularse a ninguna teoría científica, la capacidad de un péptido para unirse a una determinada molécula de MHC de Clase II para su presentación en la superficie de una APC (célula presentadora de antígeno) puede depender de varios factores; más notablemente su secuencia primaria. En algunas modalidades, se puede lograr un grado menor de inmunogenicidad diseñando ELNN que resistan el procesamiento de antígenos en células presentadoras de antígenos y/o eligiendo secuencias que no se unen bien a los receptores de MHC. En algunas modalidades, las proteínas de fusión que contienen ELNN tienen polipéptidos ELNN sustancialmente no repetitivos

diseñados para reducir la unión con receptores MHC II, así como para evitar la formación de epítopos para la unión al receptor de células T o a anticuerpos, lo que da como resultado un bajo grado de inmunogenicidad. Sin vincularse a ninguna teoría científica, evitar la inmunogenicidad es, en parte, un resultado directo de la flexibilidad conformacional de los ELNN; es decir, la falta de estructura secundaria debido a la selección y orden de los restos de aminoácidos. Por ejemplo, revisten particular interés las secuencias que tienen una baja tendencia a adaptar conformaciones plegadas de forma compacta en solución acuosa o en condiciones fisiológicas que podrían dar como resultado epítopos conformacionales. La administración de proteínas de fusión que comprenden ELNN, utilizando prácticas terapéuticas y dosificación convencionales, generalmente no daría como resultado la formación de anticuerpos neutralizantes contra los ELNN y también podría reducir la inmunogenicidad de los compañeros de fusión de BsAb (p. ej., TCE) en composiciones de paTCE.

En algunas modalidades, los ELNN utilizados en las proteínas de fusión en cuestión pueden estar sustancialmente libres de epítopos reconocidos por las células T humanas. La eliminación de tales epítopos con el fin de generar menos proteínas inmunogénicas se ha descrito anteriormente; véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/52976, WO 02/079232 y WO 00/3317, que se incorporan en el presente documento como referencia. Se han descrito ensayos para epítopos de células T humanas (Stickler, M., *et al*. (2003) *J Immunol Methods*, 281: 95-108). Revisten particular interés las secuencias peptídicas que pueden oligomerizarse sin generar epítopos de células T o secuencias no humanas. Esto se puede lograr probando repeticiones directas de estas secuencias para determinar la presencia de epítopos de células T y la aparición de secuencias hexaméricas y pentadecaméricas y, en particular, de nonaméricas que no sean humanas, y después alterando el diseño de la

secuencia de ELNN para eliminar o alterar la secuencia del epítopo. En algunas modalidades, los ELNN son sustancialmente no inmunogénicos mediante la restricción del número de epítopos del ELNN que se predice que se unirán a los receptores del MHC. Con una reducción en el número de epítopos capaces de unirse a los receptores del MHC, hay una reducción concomitante en el potencial de activación de las células T, así como en la función auxiliar de las células T, una reducción de la activación o regulación por incremento de las células B y una reducción de la producción de anticuerpos. El bajo grado de epítopos de células T predichos se puede determinar mediante algoritmos de predicción de epítopos tales como, por ejemplo, TEPITOPE (Sturniolo, T., et al. (1999) Nat Biotechnol, 17: 555-61), como se muestra en el Ejemplo 74 de Publicación de Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 2010/144502 A2, que se incorpora como referencia en su totalidad. Los aspectos de la puntuación TEPITOPE de un marco peptídico determinado dentro de una proteína son divulgados por Sturniolo, T. et al. (1999) en *Nature Biotechnology* 17:555). La puntuación oscila sobre al menos 20 log, de aproximadamente 10 a aproximadamente -10 (correspondiente a restricciones de unión de $10e^{10}$ K_D a $10e^{-10}$ K_D), y puede reducirse evitando aminoácidos hidrófobos que pueden servir como restos de anclaje durante la presentación de péptidos en MHC, tales como M, I, L, V o F. En algunas modalidades, un componente ELNN incorporado a un paTCE no tiene un epítopo de células T previsto en una puntuación TEPITOPE de aproximadamente -5 o mayor, o -6 o mayor, o -7 o mayor, o -8 o mayor, o en una puntuación TEPITOPE de -9 o mayor. Como se emplea en el presente documento, una puntuación de “-9 o mayor” abarcaría puntuaciones de TEPITOPE de 10 a -9, inclusive, pero no abarcaría una puntuación de -10, ya que -10 es menor que -9.

En algunas modalidades, los ELNN, incluidos los incorporados en las proteínas de fusión paTCE en cuestión, pueden volverse sustancialmente no inmunogénicos mediante la restricción de sitios proteolíticos conocidos de la secuencia del ELNN, reduciendo el procesamiento de ELNN a pequeños péptidos que pueden unirse a los receptores MHC II. En algunas modalidades, la secuencia de ELNN puede volverse sustancialmente no inmunogénica mediante el uso de una secuencia que está sustancialmente desprovista de estructura secundaria, lo que confiere resistencia a muchas proteasas debido a la alta entropía de la estructura. En consecuencia, la puntuación TEPITOPE reducida y la eliminación de sitios proteolíticos conocidos del ELNN pueden hacer que las composiciones de ELNN, incluido el ELNN de las composiciones de proteínas de fusión de paTCE, sean sustancialmente incapaces de unirse a receptores de mamíferos, incluidos los del sistema inmunológico. En algunas modalidades, un ELNN de una proteína de fusión de paTCE puede tener una unión con una K_D >100 nM a un receptor de mamífero, o K_D mayor de 500 nM, o K_D mayor de 1 μM hacia una superficie celular de mamífero o un receptor polipeptídico circulante. Además, la secuencia sustancialmente no repetitiva y la correspondiente falta de epítopos de tales modalidades de ELNN pueden limitar la capacidad de las células B para unirse a los ELNN o ser activadas por los mismos. En algunas modalidades, si bien un ELNN puede hacer contactos con muchas células B diferentes a lo largo de su secuencia extendida, cada célula B individual solo puede hacer uno o un pequeño número de contactos con un ELNN individual. Como resultado, los ELNN típicamente pueden tener una tendencia mucho menor a estimular la proliferación de células B y, por tanto, una respuesta inmunitaria. En algunas modalidades, el paTCE puede tener una menor inmunogenicidad en comparación con el BsAb (p. ej., TCE) correspondiente que no está fusionado a un polipéptido máscara tal como

un ELNN. En algunas modalidades, la administración de hasta tres dosis parenterales de un paTCE a un mamífero puede dar como resultado IgG anti-paTCE detectable a una dilución de suero de 1:100 pero no a una dilución de 1:1000. En algunas modalidades, la administración de hasta tres dosis parenterales de un paTCE a un mamífero puede dar como resultado IgG anti-BsAb (p. ej., TCE) detectable a una dilución de suero de 1:100 pero no a una dilución de 1:1000. En algunas modalidades, la administración de hasta tres dosis parenterales de un paTCE a un mamífero puede dar como resultado IgG anti-ELNN detectable a una dilución de suero de 1:100 pero no a una dilución de 1:1000. En algunas modalidades, el mamífero puede ser, p. ej., un ratón, una rata, un conejo, un mono cinomolgo o un ser humano. En algunas modalidades, el mamífero es un ser humano.

Una característica adicional de ciertos ELNN con secuencias sustancialmente no repetitivas con respecto a aquellas secuencias menos no repetitivas (tales como una que tiene tres aminoácidos contiguos que son idénticos) puede ser que los ELNN no repetitivos formen contactos más débiles con anticuerpos (p. ej., interacciones monovalentes), lo que da como resultado una menor probabilidad de aclaramiento inmunitario de modo que las composiciones de paTCE puedan permanecer en circulación durante un período de tiempo mayor.

En algunas modalidades, un polipéptido biológicamente activo (tal como un BsAb, p. ej., un TCE) que comprende un ELNN es menos inmunogénico en comparación con el polipéptido de fusión no conectado a ningún ELNN, en donde la inmunogenicidad se determina midiendo la producción de anticuerpos IgG que se unen selectivamente al polipéptido biológicamente activo después de la administración de dosis comparables a un sujeto.

Fragmento de código de barras

En algunas modalidades, un polipéptido (p. ej., un polipéptido de fusión o una porción del mismo tal como un ELNN) comprende uno o más fragmentos de códigos de barras (p. ej., un primer, segundo o tercer fragmentos de códigos de barras) liberables del polipéptido tras la digestión mediante una proteasa. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa que no es de mamífero. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa procariótica. Como se emplea en el presente documento, el término “fragmento de código de barras” (o “código de barras” o “secuencia de código de barras”) se puede referir a la porción del polipéptido fusionada escindiblemente dentro del polipéptido, o al fragmento peptídico resultante liberado del polipéptido.

En algunas modalidades, un fragmento de código de barras (1) es una porción de un ELNN que incluye al menos parte del motivo de secuencia (no recurrente, no solapante) que aparece (o se encuentra) solo una vez dentro del ELNN; y (2) tiene una secuencia y peso molecular diferentes de los todos los demás fragmentos peptídicos que se pueden liberar del polipéptido tras la escisión o digestión completa del polipéptido por la proteasa.

En algunas modalidades, un fragmento de código de barras no incluye el aminoácido N-terminal o el aminoácido C-terminal del polipéptido de fusión. Como se describe en el presente documento, En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se puede liberar (p. ej., configurar para que se libere) tras la digestión con Glu-C del polipéptido de fusión. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras está en un ELNN y no incluye un ácido glutámico que esté inmediatamente adyacente a otro ácido glutámico, si está presente, en el ELNN. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras tiene un ácido glutámico en su extremo C-terminal. Un experto en la técnica entenderá que el

extremo C-terminal de un fragmento de código de barras puede referirse al resto de aminoácido “último” (o el más C-terminal) dentro del fragmento de código de barras, cuando se fusiona de manera escindible dentro de un polipéptido (tal como un ELNN), incluso si otros restos de aminoácidos que no son de código de barras están colocados en el extremo C-terminal del fragmento de código de barras dentro del polipéptido (p. ej., ELNN). En algunas modalidades, un fragmento de código de barras tiene un aminoácido N-terminal que está inmediatamente precedido por un resto de ácido glutámico. En algunas modalidades, el resto de ácido glutámico que precede al aminoácido N-terminal no está inmediatamente adyacente a otro resto de ácido glutámico. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras no incluye un (segundo) resto de ácido glutámico en una posición distinta del extremo C-terminal del fragmento de código de barras a menos que el ácido glutámico esté seguido inmediatamente por una prolina. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se coloca a una distancia del extremo N-terminal del polipéptido o del extremo C-terminal del polipéptido, en donde la distancia es de 10 a 150, o de 10 a 125 aminoácidos. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se coloca dentro o en una ubicación de 300, 280, 260, 250, 240, 220, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 48, 40, 36, 30, 24, 20, 12 o 10 aminoácidos del extremo N-terminal del polipéptido, o en una ubicación en un rango entre cualquiera de los anteriores. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se coloca dentro de 200, dentro de 150, dentro de 100 o dentro de 50 aminoácidos del extremo N-terminal del polipéptido. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se coloca en una ubicación que está entre 10 y 200, entre 30 y 200, entre 40 y 150, o entre 50 y 100 aminoácidos del extremo N-terminal del polipéptido. En algunas modalidades, un fragmento de

código de barras se coloca dentro o en una ubicación de 300, 280, 260, 250, 240, 220, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 48, 40, 36, 30, 24, 20, 12 o 10 aminoácidos del extremo C-terminal del polipéptido, o en una ubicación en un rango entre cualquiera de los anteriores. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se coloca dentro de 200, dentro de 150, dentro de 100 o dentro de 50 aminoácidos del extremo C-terminal del polipéptido. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se coloca en una ubicación que está entre 10 y 200, entre 30 y 200, entre 40 y 150, o entre 50 y 100 aminoácidos del extremo C-terminal del polipéptido. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras (BAR) se caracteriza porque: (i) no incluye un ácido glutámico que esté inmediatamente adyacente a otro ácido glutámico, si está presente, en el ELNN; (ii) tiene un ácido glutámico en su extremo C-terminal; (iii) tiene un aminoácido N-terminal que está inmediatamente precedido por un resto de ácido glutámico; y (iv) está situado a una distancia del extremo N-terminal del polipéptido o del extremo C-terminal del polipéptido, en donde la distancia es de 10 a 150 aminoácidos, o de 10 a 125 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras está en un ELNN e (i) no incluye el aminoácido N-terminal o el aminoácido C-terminal del polipéptido; (ii) no incluye un ácido glutámico que esté inmediatamente adyacente a otro ácido glutámico en el ELNN; (iii) tiene un ácido glutámico en su extremo C-terminal; (iv) tiene un aminoácido N-terminal que está inmediatamente precedido por un resto de ácido glutámico; y (v) está colocado a una distancia del extremo N-terminal del polipéptido o del extremo C-terminal del polipéptido, en donde la distancia es de 10 a 150, o de 10 a 125 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el resto de ácido glutámico que precede al aminoácido N-terminal no está inmediatamente

adyacente a otro resto de ácido glutámico. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras no incluye un resto de ácido glutámico en una posición distinta del extremo C-terminal del fragmento de código de barras a menos que el ácido glutámico esté seguido inmediatamente por una prolina. Dependiendo del contexto en el presente documento y cuando se refiere a la ubicación dentro de una secuencia polipeptídica, el término “distancia” se puede referir al número de restos de aminoácidos desde el extremo N-terminal del polipéptido hasta el resto de aminoácido más N-terminal del fragmento de código de barras, o desde el extremo C-terminal del polipéptido hasta el resto de aminoácido más C-terminal del fragmento de código de barras. En algunas modalidades, para un ELNN con código de barras fusionado a un polipéptido biológicamente activo, al menos un fragmento de código de barras (o al menos dos fragmentos de códigos de barras, o tres fragmentos de códigos de barras) contenido en el ELNN con código de barras se coloca al menos 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 aminoácidos del polipéptido biológicamente activo. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras tiene al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o al menos 8 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras tiene al menos 4 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras tienes 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 aminoácidos de longitud, o en un rango entre cualquiera de los valores anteriores. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras tiene una longitud de entre 4 y 20, entre 5 y 15, entre 6 y 12 o entre 7 y 10 aminoácidos. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras comprende una secuencia de aminoácidos identificada en el presente documento mediante **SEQ ID NO: 68-79 y SEQ ID NO: 1010-1027** en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Fragmentos de códigos de barras ilustrativos liberables tras la digestión con Glu-C

Secuencia de Aminoácidos	**SEQ ID NO:**
SPATSGSTPE	**68**
GSAPATSE	**69**
GSAPGTATE	**70**
GSAPGTE	**71**
PATSGPTE	**72**
SASPE	**73**
PATSGSTE	**74**
GSAPGTSAE	**75**
SATSGSE	**76**
SGPGSTPAE	**77**
SGPGSGPGTSE	**78**
SGPGTSPSATPE	**79**
SGPGTGTSATPE	**1010**
SGPGTTPGTTPE	**1011**
SGPGTPPTSTPE	**1012**
SGPGTGSAGTPE	**1013**
SGPGTGGAGTPE	**1014**
SGPGTSPGATPE	**1015**
SGPGTSGSGTPE	**1016**
SGPGTSSASTPE	**1017**
SGPGTGAGTTPE	**1018**
SGPGTGSTSTPE	**1019**
TPGSEPATSGSE	**1020**
GSAPGTSTEPSE	**1021**
SGPGTAGSGTPE	**1022**
SGPGTSSGGTPE	**1023**
SGPGTAGPATPE	**1024**
SGPGTPGTGTPE	**1025**
SGPGTGGPTTPE	**1026**
SGPGTGSGSTPE	**1027**

En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras tiene una secuencia y peso molecular diferentes de todos los demás fragmentos peptídicos que se

pueden liberar de los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento tras la digestión completa del polipéptido quimérico mediante una proteasa que no es de mamífero. En algunas modalidades, la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

En algunas modalidades, los polipéptidos quiméricos divulgados en el presente documento comprenden un sitio de escisión por Glu-C que comprende una de las siguientes secuencias de aminoácidos: ATPESGPG, SGSETPGT y GTSESATP. En algunas modalidades, los polipéptido quiméricos divulgados en el presente documento comprenden al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: PE.GSX_nPE.SG, PE.GSX_nSE.GG, PE.GSX_nSE.TG, PE.GSX_nSE.SA, PE.SGX_nPE.SG, PE.SGX_nSE.GG, PE.SGX_nSE.TG, PE.SGX_nSE.SA, y PE.TPX_nPE.SG, PE.TPX_nSE.GG, PE.TPX_nSE.TG, PE.TPX_nSE.SA, en donde cada "." es un sitio de escisión por Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 50. En algunas modalidades, los polipéptido quiméricos divulgados en el presente documento comprenden al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: PE.SGX_nPE.SG, PE.GSX_nSE.GG, PE.TPX_nSE.TG, PE.SGX_nSE.SA. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 1 a 20. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 15. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 10. En algunas modalidades, n es 9. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 15. En algunas modalidades, X_n es SGPGTGTSATPE, SGPGSGPGTSE, SGPGTTPGTTPE, SGPGTPPTSTPE, SGPGTSPSATPE, SGPGTGSAGTPE, SGPGTGGAGTPE, SGPGTSPGATPE, SGPGTSGSGTPE, SGPGTSSASTPE, SGPGTGAGTTPE, SGPGTGSTSTPE, TPGSEPATSGSE, GSAPGTSTEPSE,

SGPGTAGSGTPE, SGPGTSSGGTPE, SGPGTAGPATPE, SGPGTPGTGTPE, SGPGTGGPTTPE, o SGPGTGSGSTPE.

En algunas modalidades, un polipéptido quimérico comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

SGPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, SGPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, SGPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, SGPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, SGPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, SGPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, ATPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, ATPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, GTSE.SATPX$_n$SGPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$ATPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$GTSE.SATP, GTSE.SATPX$_n$TTPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$STPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$GTPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$GTPE.TPGS, GTSE.SATPX$_n$SGSE.TGTP, GTSE.SATPX$_n$GTPE.GSAP, GTSE.SATPX$_n$EPSE.SATP, TTPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, TTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, TTPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, TTPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, TTPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, STPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG,

STPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP,

STPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG,

STPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS,

STPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, STPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP,

STPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, GTPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG,

GTPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP,

GTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG,

GTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS,

GTPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP,

GTPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, GTPE.TPGSX$_n$SGPE.SGPG,

GTPE.TPGSX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$GTSE.SATP,

GTPE.TPGSX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$STPE.SGPG,

GTPE.TPGSX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$GTPE.TPGS,

GTPE.TPGSX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.TPGSX$_n$GTPE.GSAP,

GTPE.TPGSX$_n$EPSE.SATP, SGSE.TGTPX$_n$SGPE.SGPG,

SGSE.TGTPX$_n$ATPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$GTSE.SATP,

SGSE.TGTPX$_n$TTPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$STPE.SGPG,

SGSE.TGTPX$_n$GTPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$GTPE.TPGS,

SGSE.TGTPX$_n$SGSE.TGTP, SGSE.TGTPX$_n$GTPE.GSAP,

SGSE.TGTPX$_n$EPSE.SATP, GTPE.GSAPX$_n$SGPE.SGPG,

GTPE.GSAPX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$GTSE.SATP,

GTPE.GSAPX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$STPE.SGPG,

GTPE.GSAPX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$GTPE.TPGS,

GTPE.GSAPX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.GSAPX$_n$GTPE.GSAP,

GTPE.GSAPX$_n$EPSE.SATP, EPSE.SATPX$_n$SGPE.SGPG,

EPSE.SATPX$_n$ATPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTSE.SATP, EPSE.SATPX$_n$TTPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$STPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTPE.TPGS, EPSE.SATPX$_n$SGSE.TGTP, EPSE.SATPX$_n$GTPE.GSAP, o EPSE.SATPX$_n$EPSE.SATP, en donde cada "." es un sitio de escisión por Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 50. En algunas modalidades, el polipéptido quimérico comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

SGPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.GSAPX$_n$EPSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, o STPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, en donde cada "." es un sitio de escisión por Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 30. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 1 a 20. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 15. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 3 a 7. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 10. En algunas modalidades, n es 9. En algunas modalidades, n es 4. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 15. En algunas modalidades, en donde X$_n$ es PGTGTSAT, PGSGPGT, PGTTPGTT, PGTPPTST, PGTSPSAT, PGTGSAGT, PGTGGAGT, PGTSPGAT, PGTSGSGT, PGTSSAST,

PGTGAGTT, PGTGSTST, GSEPATSG, APGTSTEP, PGTAGSGT, PGTSSGGT, PGTAGPAT, PGTPGTGT, PGTGGPTT, o PGTGSGST. En algunas modalidades, X_n es TGTS, SGP, TTPG, TPPT, TSPS, TGSA, TGGA, TSPG, TSGS, TSSA, TGAG, TGST, EPAT, GTST, TAGS, TSSG, TAGP, TPGT, TGGP, o TGSG.

En algunas modalidades, los códigos de barras están diseñados para tener propiedades analíticas mejoradas. En algunas modalidades, tales códigos de barras pueden liberarse con concentraciones relativamente modestas de una proteasa que no sea de mamífero tal como Glu-C. Esto facilita una mejor detección, p. ej., mediante LC/MS, y también permite la medición de péptidos que se generan a partir del conector escindible, permitiendo así una medición de los productos de escisión utilizando, p. ej., LC/MS.

En algunas modalidades de proteínas de fusión que comprenden un ELNN, la proteína de fusión tiene una sola cadena polipeptídica, y la cadena polipeptídica comprende un fragmento de código de barras que está en una posición dentro de la cadena polipeptídica que está a una distancia de 10 a 200 aminoácidos o de 10 a 125 aminoácidos del extremo N-terminal o del extremo C-terminal de la cadena polipeptídica. En algunas modalidades, una proteína de fusión (tal como un paTCE) comprende un primer ELNN y un segundo ELNN, el primer ELNN está en el lado N-terminal del dominio de anticuerpo biespecífico, y el primer fragmento de código de barras se sitúa a una distancia de 150, 100, o 50 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína de fusión. En algunas modalidades, el segundo ELNN está en el lado C-terminal del dominio de anticuerpo biespecífico, y el segundo fragmento de código de barras se sitúa a una distancia de 150, 100, o 50 aminoácidos del extremo C-terminal del polipéptido quimérico.

En algunas modalidades, un ELNN comprende adicionalmente uno o más fragmentos de códigos de barras adicionales, en donde cada uno de los uno o más fragmentos de códigos de barras adicionales tiene una secuencia y peso molecular diferentes de los de todos los demás fragmentos de péptidos que se pueden liberar del polipéptido tras la digestión completa del polipéptido por la proteasa. En algunas modalidades, un ELNN con código de barras comprende solo un fragmento de código de barras. En algunas modalidades, un ELNN con código de barras comprende un conjunto de fragmentos de códigos de barras, que comprende un primer fragmento de código de barras, tal como los descritos en el presente documento. En algunas modalidades, el conjunto de fragmentos de códigos de barras comprende un segundo fragmento de código de barras (o un fragmento de código de barras adicional), tal como los descritos en el presente documento. En algunas modalidades, el conjunto de fragmentos de códigos de barras comprende un tercer fragmento de código de barras, tal como los descritos en el presente documento.

Un conjunto de fragmentos de códigos de barras fusionados dentro de un ELNN N-terminal puede denominarse un conjunto de códigos de barras N-terminal (un “conjunto N-terminal”). Un conjunto de fragmentos de códigos de barras fusionados dentro de un ELNN C-terminal puede denominarse conjunto de códigos de barras C-terminal (un “conjunto C-terminal”). En algunas modalidades, el conjunto N-terminal comprende un primer fragmento de código de barras y un segundo fragmento de código de barras. En algunas modalidades, el conjunto N-terminal comprende adicionalmente un tercer fragmento de código de barras. En algunas modalidades, el conjunto C-terminal comprende un primer fragmento de código de barras y un segundo fragmento de código de barras. En algunas modalidades, el conjunto C-terminal

comprende adicionalmente un tercer fragmento de código de barras. En algunas modalidades, el polipéptido comprende un conjunto de fragmentos de códigos de barras que incluye un primer fragmento de código de barras, un (segundo) fragmento de código de barras adicional y al menos un fragmento de código de barras adicional, en donde cada fragmento de código de barras del conjunto de fragmentos de códigos de barras (1) es una porción del segundo ELNN y (2) tiene una secuencia y peso molecular diferentes de los de todos los demás fragmentos de péptidos que se pueden liberar del polipéptido tras la digestión completa del polipéptido por la proteasa.

En el presente documento se incluye una mezcla que comprende una pluralidad de polipéptidos de longitud variable; comprendiendo la mezcla un primer conjunto de polipéptidos y un segundo conjunto de polipéptidos. En algunas modalidades, cada polipéptido del primer conjunto de polipéptidos comprende un fragmento de código de barras que (a) se puede liberar del polipéptido mediante digestión con una proteasa y (b) tiene una secuencia y un peso molecular que difieren de la secuencia y el peso molecular de todos los demás fragmentos que se pueden liberar del primer conjunto de polipéptidos. En algunas modalidades, el segundo conjunto de polipéptidos carece del fragmento de código de barras del primer conjunto de polipéptidos (p. ej., debido al truncamiento). En algunas modalidades, tanto el primer conjunto de polipéptidos como el segundo conjunto de polipéptidos comprenden cada uno un fragmento de referencia que (a) es común al primer conjunto de polipéptidos y al segundo conjunto de polipéptidos y (b) se puede liberar mediante digestión con la proteasa. En algunas modalidades, la razón entre el primer conjunto de polipéptidos y los polipéptidos que comprenden el fragmento de referencia es superior a 0,70. En algunas modalidades, la razón entre el primer conjunto de polipéptidos y los polipéptidos que comprenden el fragmento de referencia es mayor

que 0,80, 0,90, 0,95 o 0,98. En algunas modalidades, el fragmento de referencia aparece no más de una vez en cada polipéptido del primer conjunto de polipéptidos y el segundo conjunto de polipéptidos. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa que escinde en el lado C-terminal de restos de ácido glutámico. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa Glu-C. En algunas modalidades, la proteasa no es tripsina. En algunas modalidades, los polipéptidos de longitudes variables comprenden polipéptidos que comprenden al menos un ELNN, tal como cualquiera de los descritos en el presente documento. En algunas modalidades, el primer conjunto de polipéptidos comprende un polipéptido de longitud completa, en donde el fragmento de código de barras es una porción del polipéptido de longitud completa. En algunas modalidades, el polipéptido de longitud completa es un polipéptido (de fusión), tal como cualquiera de los descritos anteriormente o descritos en cualquier otro lugar del presente documento. En algunas modalidades, los polipéptidos de longitudes variables en una mezcla difieren entre sí debido al truncamiento N-terminal, al truncamiento C-terminal o al truncamiento N- y C-terminal de un polipéptido de longitud completa. En algunas modalidades, el primer conjunto de polipéptidos y el segundo conjunto de polipéptidos pueden diferir en una o más propiedades farmacológicas.

La presente divulgación también proporciona métodos para evaluar, en una mezcla que comprende polipéptidos de longitud variable, una cantidad relativa de un primer conjunto de polipéptidos en la mezcla con respecto a un segundo conjunto de polipéptidos en la mezcla, en donde (1) cada polipéptido del primer conjunto de polipéptidos comparte un fragmento de código de barras que aparece una vez y sólo una vez en el polipéptido y (2) cada polipéptido del segundo conjunto de polipéptidos carece del fragmento de código de barras que comparten los

polipéptidos del primer conjunto, en donde los polipéptidos individuales tanto del primero de los polipéptidos y el segundo conjunto de polipéptidos comprende cada uno un fragmento de referencia. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto la mezcla con una proteasa para producir una pluralidad de fragmentos proteolíticos que resultan de la escisión del primer conjunto de polipéptidos y el segundo conjunto de polipéptidos, en donde la pluralidad de fragmentos proteolíticos comprende una pluralidad de fragmentos de referencia y una pluralidad de fragmentos de códigos de barras. En algunas modalidades, los métodos pueden comprender adicionalmente determinar una razón entre la cantidad de fragmentos de códigos de barras y la cantidad de fragmentos de referencia, evaluando así las cantidades relativas del primer conjunto de polipéptidos con respecto al segundo conjunto de polipéptidos. En algunas modalidades, el fragmento de código de barras aparece no más de una vez en cada polipéptido del primer conjunto de polipéptidos. En algunas modalidades, el fragmento de referencia aparece no más de una vez en cada polipéptido del primer conjunto de polipéptidos y el segundo conjunto de polipéptidos. En algunas modalidades, la pluralidad de fragmentos proteolíticos comprende una pluralidad de fragmentos de referencia y una pluralidad de fragmentos de códigos de barras. En algunas modalidades, la proteasa escinde el primer y segundo conjunto de polipéptidos (o los polipéptidos de longitud variable) en el lado C-terminal de los restos de ácido glutámico que no están seguidos por un resto de prolina. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa Glu-C. En algunas modalidades, la proteasa no es tripsina. En algunas modalidades, la etapa de determinación de una razón entre la cantidad de fragmentos de códigos de barras y la cantidad de fragmentos de referencia comprende identificar fragmentos de códigos de barras y

fragmentos de referencia de la mezcla después de que se haya puesto en contacto con la proteasa. En algunas modalidades, los fragmentos de códigos de barras y los fragmentos de referencia se identifican en función de sus respectivas masas. En algunas modalidades, los fragmentos de códigos de barras y los fragmentos de referencia se identifican mediante espectrometría de masas.

En algunas modalidades, los fragmentos de códigos de barras y los fragmentos de referencia se identifican mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). En algunas modalidades, la etapa de determinación de una razón de los fragmentos de códigos de barras con respecto a los fragmentos de referencia comprende un marcaje isobárico. En algunas modalidades, la etapa de determinación de una razón de los fragmentos de códigos de barras con respecto a los fragmentos de referencia comprende añadir a la mezcla uno o ambos de un fragmento de referencia marcado con isótopos y un fragmento de código de barras marcado con isótopos. En algunas modalidades, los polipéptidos de longitudes variables comprenden polipéptidos que comprenden al menos un ELNN, como se describió anteriormente o se describe en cualquier otro lugar en el presente documento. En algunas modalidades, el ELNN se caracteriza porque (i) comprende al menos 100 o al menos 150 aminoácidos; (ii) al menos 90 % de los restos de aminoácidos del ELNN son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P); y (iii) comprende al menos 4 tipos diferentes de aminoácidos que son G, A, S, T, E o P. En algunas modalidades, el fragmento de código de barras, cuando está presente, es una porción del ELNN. En algunas modalidades, la mezcla de polipéptidos de longitudes variables comprende un polipéptido como cualquiera de los descritos anteriormente o descritos en cualquier otro lugar en el presente documento. En algunas modalidades, los polipéptidos de longitud variable comprenden un polipéptido de longitud completa

y fragmentos truncados del mismo. En algunas modalidades, los polipéptidos de longitud variable consisten esencialmente en el polipéptido de longitud completa y fragmentos truncados del mismo. En algunas modalidades, los polipéptidos de longitudes variables en una mezcla difieren entre sí debido al truncamiento N-terminal, al truncamiento C-terminal o al truncamiento N- y C-terminal de un polipéptido de longitud completa. En algunas modalidades, el polipéptido de longitud completa es un polipéptido como se describió anteriormente o se describe en cualquier otro lugar en el presente documento. En algunas modalidades, la razón entre la cantidad de fragmentos de códigos de barras y fragmentos de referencia es mayor que 0,50, 0,60, 0,70, 0,80, 0,90, 0,95, 0,98 o 0,99.

Cuantificación de péptidos basada en marcaje isobárico

En algunas modalidades, se puede utilizar marcaje isobárico para determinar una razón de los fragmentos de códigos de barras con respecto a los fragmentos de referencia. El marcaje isobárico es una estrategia de espectrometría de masas utilizada en proteómica cuantitativa, en donde péptidos o proteínas (o porciones de los mismos) se marcan con varios grupos químicos que son isobáricos (de masa idéntica) pero que varían en términos de distribución de isótopos pesados alrededor de su estructura. En algunas modalidades, estas etiquetas, comúnmente denominadas etiquetas de masa en tándem, están diseñadas para que la etiqueta de masa se escinda en una región conectora específica tras la disociación inducida por colisión (CID) de alta energía durante la espectrometría de masas en tándem, produciendo así iones indicadores de diferentes masas. Algunas de las etiquetas isobáricas más comunes son etiquetas reactivas con aminas.

Polipéptidos ELNN con código de barras ilustrativos

En el presente documento se incluyen ELNN que comprenden fragmentos de códigos de barras que son partes de los ELNN.

Las secuencias de aminoácidos de ELNN con códigos de barras ilustrativos, que contienen un código de barras (p. ej., SEQ ID NOS: 8002-8003, 8005-8009 y 8013-8022), o dos códigos de barras (p. ej., SEQ ID NOS: 8001, 8004 y 8012), o tres códigos de barras (p. ej., SEQ ID NO: 8011), se ilustran en la Tabla 3a, identificándose los códigos de barras en negrita. En algunas modalidades, entre estos ELNN con código de barras ilustrativos, 12 (SEQ ID NO: 8001-8003, 8008-8009, 8011, 8015-8019 y 8022) se fusionarán con una proteína biológicamente activa (tal como un TCE) en el C-terminal de la proteína biológicamente activa, y 10 (SEQ ID NOS: 8004-8007, 8010, 8012-8014, 8020 y 8021) se fusionarán en el N-terminal de la proteína biológicamente activa. En algunas modalidades, el ELNN tiene al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia identificada en el presente documento mediante SEQ ID NO: 8001-8022 en la Tabla 3a.

Tabla 3a. ELNN con códigos de barras ilustrativos

SEQ ID NO.	**Tipo de ELNN**	**Núm. de Códigos de Barras**	**Secuencia de Aminoácidos**	**Núm. Total de AA**
8001	ELNN C-terminal	2	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS	864

SEQ ID NO.	Tipo de ELNN	Núm. de Códigos de Barras	Secuencia de Aminoácidos	Núm. Total de AA
			GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGftabTSESATPESGPGSE**PATSGPT** **E**SGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE **GSAPGTE**STPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGEPEA	
8002	ELNN C-terminal	1	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSE**PATSGPTE**SG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGEPEA	864
8003	ELNN C-terminal	1	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG	864

SEQ ID NO.	Tipo de ELNN	Núm. de Códigos de Barras	Secuencia de Aminoácidos	Núm. Total de AA
			SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE**GSAPGTE**STPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGEPEA	
8004	ELNN N-terminal	2	ASSPAGSPTSTESGTSESATPESGPGTETEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE**SGPGSTPAE**SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGE**SPATSGSTPE**GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSEPSEGSAPGGSAP	288
8005	ELNN N-terminal	1	ASSPAGSPTSTESGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGE**SPATSGSTPE**GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSEPSEGSAPGGSAP	288
8006	ELNN N-terminal	1	ASSPAGSPTSTESGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE**SGPGSTPAE**SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGEEPATSGSTPEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSEPSEGSAPGGSAP	288
8007	ELNN N-terminal	1	ASSPAGSPTSTESGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE**SGPGSTPAE**SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSEPSEGSAPGGSAP	288
8008	ELNN C-terminal	1	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSEPSEGSAPGGSAP	864

SEQ ID NO.	Tipo de ELNN	Núm. de Códigos de Barras	Secuencia de Aminoácidos	Núm. Total de AA
			GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE**GSA** **PGTE**STPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPG	
8009	ELNN C-terminal	1	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSE**GSAPGTE**STPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP G	576
8010	ELNN N-terminal	2	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPE**SGPGSTPAE**SGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE**PA** **TSGSTE**TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTESAS	1152
8011	ELNN C-terminal	3	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS	1152

SEQ ID NO.	Tipo de ELNN	Núm. de Códigos de Barras	Secuencia de Aminoácidos	Núm. Total de AA
			TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSE**PATSGSTE**TPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE**GSAPGTAT E**SPEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSE**GSAPGT SAE**SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTESAS	
8012	ELNN N-terminal	2	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE **GSAPATSE**SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSE**SASPE**SGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP	864
8013	ELNN N-terminal	1	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSE**SATSGSE**TPGSEPAT	864

SEQ ID NO.	Tipo de ELNN	Núm. de Códigos de Barras	Secuencia de Aminoácidos	Núm. Total de AA
			SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP	
8014	ELNN N-terminal	1	SPAGSPTSTESGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE **SGPGSTPAESGSE**TPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGGSAP	292
8015	ELNN C-terminal	1	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSE**GSAPGTE**STPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GEPEA	582
8016	ELNN C-terminal	1	TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG	576

SEQ ID NO.	Tipo de ELNN	Núm. de Códigos de Barras	Secuencia de Aminoácidos	Núm. Total de AA
			SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSE**SATSGSE**TPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESA	
8017	ELNN C-terminal	1	GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE**SASPE**SG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGP	576
8018	ELNN C-terminal	1	GSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE**PA TSGSTE**TGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATS	576
8019	ELNN C-terminal	1	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE**SA SPE**SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESAT	576

SEQ ID NO.	Tipo de ELNN	Núm. de Códigos de Barras	Secuencia de Aminoácidos	Núm. Total de AA
8020	ELNN N-terminal	1	ASSPAGSPTSTESGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PE**SGPGSTPA**ESGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGGSAP	294
8021	ELNN N-terminal	1	ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE**SGP GSGPGTSE**SATPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATP	294
8022	ELNN C-terminal	1	ATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE**SGPGTS PSATPE**SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESAGEPEA	582

En algunas modalidades, se puede obtener un ELNN con código de barras realizando una o más mutaciones en el ELNN existente, tal como cualquiera enumerada en la Tabla 3b, de acuerdo con uno o más de los siguientes criterios: minimizar el cambio de secuencia en el ELNN, minimizar el cambio de composición de aminoácidos en el ELNN, mantener sustancialmente la carga neta del ELNN, mantener sustancialmente (o mejorar) la baja inmunogenicidad del ELNN y mantener sustancialmente (o mejorar) las propiedades farmacocinéticas del ELNN. En algunas modalidades, la secuencia de ELNN tiene al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de

secuencia con uno cualquiera de SEQ ID NO: 601-659 enumerados en la Tabla 3b. En algunas modalidades, la secuencia de ELNN, que tiene al menos 90 % (p. ej., al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %) pero menos de 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 601-659 enumerados en la Tabla 3b, se obtiene mediante una o más mutaciones (p. ej., menos de 10, menos de 8, menos de 6, menos de 5, menos de 4, menos de 3, menos de 2 mutaciones) de la secuencia correspondiente de la Tabla 3b. En algunas modalidades, las una o más mutaciones comprenden la deleción de un resto de ácido glutámico, la inserción de un resto de ácido glutámico, la sustitución de un resto de ácido glutámico o la sustitución por un resto de ácido glutámico, o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, donde la secuencia de ELNN difiere de, pero tiene al menos 90 % (p. ej., al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %) de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 601-659 enumerados en la Tabla 3b, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 % o aproximadamente 100 % de la diferencia entre la secuencia de ELNN y la secuencia correspondiente de la Tabla 3b implican deleción de un resto de ácido glutámico, inserción de un resto de ácido glutámico, sustitución de un resto de ácido glutámico o sustitución por un resto de ácido glutámico, o cualquier combinación de las mismas. En algunas de tales modalidades, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 % o aproximadamente 100 % de la diferencia entre la secuencia de ELNN y la secuencia correspondiente de la Tabla 3b implica una sustitución de un resto ácido glutámico, o una sustitución por un resto de ácido glutámico, o ambas.

La “sustitución de un primer aminoácido”, como se emplea en el presente documento, se refiere al reemplazo del primer resto de aminoácido por un segundo resto de

aminoácido, lo que da como resultado que el segundo resto de aminoácido ocupe su lugar en la posición de sustitución en la secuencia obtenida. Por ejemplo, “una sustitución de ácido glutámico” se refiere al reemplazo del resto de ácido glutámico (E) por un resto distinto de ácido glutámico (p. ej., serina (S)).

Tabla 3b. ELNN existente ilustrativos para modificación genética a ELNN con códigos de barras

Nombre de ELNN	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
AE144	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP	**601**
AE144_1A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	**602**
AE144_2A	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG	**603**
AE144_2B	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG	**604**
AE144_3A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG	**605**
AE144_3B	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG	**606**
AE144_4A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	**607**
AE144_4B	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	**608**
AE144_5A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG	**609**
AE144_6B	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	**610**
AE288_1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	**611**

Nombre de ELNN	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
AE288_2	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	**612**
AE576	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAP	**613**
AE624	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP	**614**
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	**615**
AE865	GGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE	**616**

Nombre de ELNN	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
	EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	
AE866	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	**617**
AE1152	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	**618**
AE144A	STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGS	**619**
AE144B	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG	**620**
AE180A	TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS	**621**

Nombre de ELNN	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
AE216A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESAT	**622**
AE252A	ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSE	**623**
AE288A	TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA	**624**
AE324A	PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS	**625**
AE360A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESAT	**626**
AE396A	PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPS	**627**
AE432A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS	**628**
AE468A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE	**629**

Nombre de ELNN	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
	PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	
AE504A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPS	**630**
AE540A	TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE P	**631**
AE576A	TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESA	**632**
AE612A	GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	**633**
AE648A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES	**634**

Nombre de ELNN	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
	ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGTSESAT	
AE684A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSEPATS	**635**
AE720A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE	**636**
AE756A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSES	**637**
AE792A	EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATS	**638**

Nombre de ELNN	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
	GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS	
AE828A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	**639**
AE869	GSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGR	**640**
AE144_R1	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTESASR	**641**
AE288_R1	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASR	**642**
AE432_R1	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTESASR	**643**
AE576_R1	SAGSPTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP	**644**

Nombre de ELNN	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
	SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASR	
AE864_R1	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTESASR	**645**
AE712	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEAHHH	**646**
AE864_R2	GSPGAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTESASR	**647**

Nombre de ELNN	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
AE288_3	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG	**648**
AE284	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE	**649**
AE292	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGG SAP	**650**
AE864_2	AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGAAEPEA	**651**
AE867	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGAAEPEA	**652**
AE867_2	SPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS	**653**

Nombre de ELNN	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
	TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	
AE868	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGAAEPEA	**654**
AE144_7A	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	**655**
AE292	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGG SAP	**656**
AE293	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPEGA AEPEA	**657**
AE300	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAG AAEPEA	**658**
AE584	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA	**659**

Nombre de ELNN	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
	PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGAAEPEA	

En algunas modalidades, para construir la secuencia de un ELNN con código de barras, se realizan mutaciones de aminoácidos en ELNN de longitudes intermedias con respecto a las de la Tabla 3b, así como ELNN de longitudes más largas que las de la Tabla 3b, tales como aquellas en las que se añaden uno o más motivos dodecaméricos de la Tabla 1 al extremo N-terminal o C-terminal de un ELNN de uso general de la Tabla 3b.

Los ejemplos adicionales de ELNN existentes que se pueden utilizar según la presente divulgación se divulgan en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 o 2011/0172146 A1, o las Publicaciones de Patente Internacional Núm. WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1, WO 2011028344 A2, WO 2014/011819 A2 o WO 2015/02 3891; cada una de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia.

En algunas modalidades, un ELNN con código de barras fusionado dentro de una cadena polipeptídica adyacente al extremo N-terminal de la cadena polipeptídica (“ELNN N-terminal”) puede anclarse a una etiqueta de His de HHHHHH (SEQ ID NO: 48) o HHHHHHHH (SEQ ID NO: 49) en el extremo N-terminal para facilitar la purificación del polipéptido de fusión. En algunas modalidades, un ELNN con código

de barras fusionado dentro de una cadena polipeptídica en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica (“ELNN C-terminal”) puede comprender o anclarse a la secuencia EPEA en el extremo C-terminal para facilitar la purificación del polipéptido de fusión. En algunas modalidades, el polipéptido de fusión comprende tanto un ELNN con código de barras N-terminal como un ELNN con código de barras C-terminal, en donde el ELNN con código de barras N-terminal está anclado a una etiqueta de His de HHHHHH (SEQ ID NO: 48) o HHHHHHHH (SEQ ID NO: 49) en el extremo N-terminal; y en donde el ELNN con código de barras C-terminal está anclado la secuencia EPEA en el extremo C-terminal, facilitando así la purificación del polipéptido de fusión, por ejemplo, hasta al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de pureza mediante métodos de cromatografía conocidos en la técnica, que incluyen, entre otros, cromatografía IMAC, matriz de afinidad C-tagXL y otros métodos similares.

Un fragmento de código de barras, como se describe en el presente documento, se puede fusionar de manera escindible dentro del ELNN y liberarse (es decir, configurarse para liberarse) del ELNN tras la digestión del polipéptido mediante una proteasa. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa Glu-C. En algunas modalidades, la proteasa escinde en el lado C-terminal de los restos de ácido glutámico que no van seguidos de prolina. En algunas modalidades, un ELNN con código de barras (un ELNN que contiene fragmentos de códigos de barras en su interior) está diseñado para lograr una alta eficiencia, precisión y exactitud de la digestión con proteasa. Por ejemplo, En algunas modalidades, los restos de Glu-Glu (EE) adyacentes en una secuencia de ELNN pueden dar como resultado patrones de escisión variables tras la digestión con Glu-C. En consecuencia, cuando se utiliza proteasa Glu-C para la liberación de códigos de barras, el ELNN con código de barras

o los fragmentos de códigos de barras pueden no contener ninguna secuencia Glu-Glu (EE). Además, es posible que la proteasa Glu-C no escinda una secuencia de dipéptido Glu-Pro (EP), si está presente en el polipéptido de fusión, durante el proceso de liberación del código de barras.

Configuración estructural de TCE activables

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende un único BsAb en forma de TCE y un único ELNN. En algunas modalidades, tal proteína de fusión puede tener al menos las siguientes permutaciones de configuraciones, cada una enumerada en una orientación del extremo N-terminal al C-terminal: (TCE)-(ELNN); (ELNN)-(TCE); (TCE)-(Conector)-(ELNN); y (ELNN)-(Conector)-(TCE).

En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende un ELNN C-terminal y, opcionalmente, un conector (tal como uno descrito en el presente documento, p. ej., en la Tabla C) entre el ELNN y el TCE. En algunas modalidades, tal proteína de fusión se puede representar mediante la Fórmula I (representada del extremo N-terminal al C-terminal):

(TCE)-(Conector)-(ELNN) (I),

en donde el TCE es el descrito en el presente documento; Conector es una secuencia conectora (tal como una descrita en el presente documento, p. ej., en la Tabla C) que comprende entre 1 y aproximadamente 50 restos de aminoácidos que pueden incluir opcionalmente un segmento de liberación de TCE (p. ej., como se describe en el presente documento); y el ELNN puede ser cualquier ELNN descrito en el presente documento.

En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende un ELNN N-terminal y, opcionalmente, un conector (tal como uno descrito en el presente documento, p. ej., en la Tabla C) entre el ELNN y el TCE. En algunas modalidades, tal proteína de fusión se puede representar mediante la Fórmula II (representada del extremo N-terminal al C-terminal):

(ELNN)-(Conector)-(TCE) (II),

en donde el TCE es el descrito en el presente documento; Conector es una secuencia conectora (tal como una descrita en el presente documento, p. ej., en la Tabla C) que comprende entre 1 y aproximadamente 50 restos de aminoácidos que pueden incluir opcionalmente un segmento de liberación de TCE (p. ej., como se describe en el presente documento); y ELNN puede ser cualquier ELNN descrito en el presente documento.

En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende tanto un ELNN N-terminal como un ELNN C-terminal. En algunas modalidades, tal proteína de fusión se puede representar mediante la Fórmula III:

(ELNN)-(Conector)-(TCE)-(Conector)-(ELNN) (III)

en donde el TCE es el descrito en el presente documento; cada Conector es, individualmente, una secuencia conectora (tal como una descrita en el presente documento, p. ej., en la Tabla C) que tiene entre 1 y aproximadamente 50 restos de aminoácidos que pueden incluir opcionalmente un segmento de liberación de TCE

(p. ej., como se describe en el presente documento); y cada ELNN puede ser, individualmente, cualquier ELNN descrito en el presente documento.

La presente divulgación proporciona BsAb (p. ej., TCE) que comprenden una o más secuencias divulgadas en el presente documento en una cualquiera de las Tablas 6a-6g.

Revisten particular interés los BsAb (p. ej., TCE) para los que se busca un aumento en un parámetro farmacocinético, una mayor solubilidad, una mayor estabilidad, un enmascaramiento de la actividad o alguna otra propiedad farmacéutica mejorada, o aquellos BsAb (p. ej., TCE) para los cuales aumentar la semivida terminal mejoraría la eficacia y/o la seguridad. Por tanto, las composiciones de proteína de fusión de paTCE se preparan con varios objetivos en mente, incluyendo mejorar la eficacia terapéutica del TCE, por ejemplo, aumentando la exposición *in vivo* o el tiempo que el TCE permanece dentro de la ventana terapéutica cuando se administra a un sujeto en comparación con una TCE no conectado a cualquier ELNN.

Se apreciará que se pueden realizar diversas sustituciones de aminoácidos (especialmente sustituciones de aminoácidos conservativas) en una secuencia biespecífica para crear variantes sin apartarse del espíritu de la presente divulgación con respecto a la actividad biológica o las propiedades farmacológicas, por ejemplo, de un TCE. En la Tabla 4 se muestran ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos en secuencias polipeptídicas. Además, las variantes también pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos en donde uno o más restos de aminoácidos se añaden o eliminan en el extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa de un TCE que retiene al menos una parte de la actividad biológica del péptido nativo.

En algunas modalidades, las secuencias que conservan al menos aproximadamente 40 %, o aproximadamente 50 %, o aproximadamente 55 %, o aproximadamente 60 %, o aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % o más de la actividad comparada con la secuencia de TCE original correspondiente se considerarían adecuadas para su inclusión en el paTCE en cuestión. En algunas modalidades, un TCE que se encuentra que conserva un nivel adecuado de actividad se puede conectar a uno o más polipéptidos ELNN, que tienen al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia (p. ej., al menos aproximadamente 81 %, al menos aproximadamente 82 %, al menos aproximadamente 83 %, al menos aproximadamente 84 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o 100 % de identidad de secuencia) con una secuencia de las Tablas 3a-3b.

Tabla 4: Sustituciones de aminoácidos conservativas ilustrativas

Resto Original	**Sustituciones Ilustrativas**
Ala (A)	val; leu; ile
Arg (R)	lys; gin; asn
Asn (N)	gin; his; lys; arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser

Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro
His (H)	asn: gin: lys: arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe: norleucina
Leu (L)	norleucina: ile: val; met; ala: phe
Lys (K)	arg: gin: asn
Met (M)	leu; phe; ile
Phe (F)	leu: val: ile; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr(Y)	trp: phe: thr: ser
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina

La presente divulgación proporciona TCE ELNNilados (tales como paTCE) que se dirigen a PSMA, en donde el TCE es un anticuerpo biespecífico (p. ej., un TCE biespecífico) que se une específicamente a PSMA con una porción del TCE biespecífico y a CD3 con la otra porción del TCE biespecífico.

En algunas modalidades, el TCE ELNNilado comprende (1) una primera porción que comprende un primer dominio de unión y un segundo dominio de unión, y (2) una segunda porción que comprende un segmento de liberación, y (3) una tercera porción que comprende una máscara polipeptídica no estructurada (a veces también denominada en el presente documento radical de enmascaramiento).

En algunas modalidades, el TCE ELNNilado comprende la configuración de Fórmula Ia (representada de extremo N-terminal al extremo C-terminal):

(primera porción)-(segunda porción)-(tercera porción) (Ia)

en donde la primera porción es un dominio de anticuerpo biespecífico que comprende dos dominios de unión a antígeno como se indicó anteriormente, en donde el primer dominio de unión tiene afinidad de unión específica a PSMA (p. ej., expresado en una célula cancerosa) y el segundo dominio de unión tiene afinidad de unión específica a una CD3. (p. ej., expresado en una célula efectora); la segunda porción comprende un segmento de liberación (RS) susceptible de ser escindido por una proteasa de mamífero; y la tercera porción es un radical de enmascaramiento que sirve para enmascarar las propiedades biológicas del dominio del anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el RS es un segmento de liberación escindible por proteasa que es escindible por una proteasa que está presente en un microambiente tumoral.

En algunas modalidades en las que la primera porción comprende un dominio de unión que comprende un VHH y un dominio de unión que comprende un VL y VH, los dominios de unión de la primera porción pueden estar en el orden (VL-VH)1-(VHH)2, en donde “1” y “2” representan el primer y segundo dominios de unión, respectivamente, o (VH-VL)1-(VHH)2, o (VHH)1-(VL-VH)2, o (VHH)1-(VH-VL)2, en donde los dominios de unión emparejados están conectados mediante un conector polipeptídico (p. ej., como se describe en el presente documento). En algunas modalidades en las que la primera porción comprende dos dominios de unión que comprenden cada uno de ellos un VL y VH, los dominios de unión de la primera porción pueden estar en el orden (VL-VH)1-(VL-VH)2, en donde “1” y “2” representan el primer y segundo dominios de unión, respectivamente, o (VL-VH)1-(VH-VL)2, o (VH-VL)1-(VL-VH)2, o (VH-VL)1- (VH-VL)2, en donde los dominios de unión emparejados están conectados mediante un conector polipeptídico (p. ej., como se describe en el presente documento).

En algunas modalidades, el dominio que se une a PSMA es un VHH.

En algunas modalidades, los dominios de unión de la primera porción comprenden secuencias proporcionadas en las Tablas 6a-6g, en donde las Tablas 6a-e muestran secuencias que se unen a CD3 y las Tablas 6f-h muestran secuencias que se unen a PSMA; la secuencia de RS comprende una secuencia proporcionada en las Tablas 8a-8b (p. ej., como se describe en el presente documento); y el radical de enmascaramiento es un ELNN. En algunas modalidades, el radical de enmascaramiento es un ELNN que tiene al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia que comprende el grupo de secuencias expuestas en las Tablas 3a-3b. En algunas modalidades, la composición es una proteína de fusión recombinante. En algunas modalidades, las porciones están conectadas mediante conjugación química.

En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende la configuración de Fórmula IIa (representada del extremo N-terminal al extremo C-terminal):

(tercera porción)-(segunda porción)-(primera porción) (IIa)

en donde la primera porción es una biespecífica que comprende dos dominios de unión a antígeno en donde el primer dominio de unión tiene afinidad de unión específica a un PSMA (p. ej., expresado en una célula cancerosa) y el segundo dominio de unión tiene afinidad de unión específica a CD3 (p. ej., expresado en una célula efectora); la segunda porción comprende un segmento de liberación (RS) susceptible de ser escindido por una proteasa de mamífero; y la tercera porción es un radical de enmascaramiento que sirve para enmascarar las propiedades biológicas del dominio del anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el RS

es un segmento de liberación escindible por proteasa que es universalmente escindible en un microambiente tumoral.

En algunas modalidades en las que la primera porción comprende un dominio de unión que comprende un VHH y un dominio de unión que comprende un VL y VH, los dominios de unión de la primera porción pueden estar en el orden (VL-VH)1-(VHH)2, en donde “1” y “2” representan el primer y segundo dominios de unión, respectivamente, o (VH-VL)1-(VHH)2, o (VHH)1-(VL-VH)2, o (VHH)1-(VH- VL)2, en donde los dominios de unión emparejados están conectados mediante un conector polipeptídico (p. ej., como se describe en el presente documento). En algunas modalidades en las que la primera porción comprende dos dominios de unión que comprenden cada uno de ellos un VL y VH, los dominios de unión de la primera porción pueden estar en el orden (VL-VH)1-(VL-VH)2, en donde “1” y “2” representan el primer y segundo dominios de unión, respectivamente, o (VL-VH)1-(VH-VL)2, o (VH-VL)1-(VL-VH)2, o (VH-VL)1-(VH-VL)2, en donde los dominios de unión emparejados están conectados mediante un conector polipeptídico (p. ej., como se describe en el presente documento).

En algunas modalidades, el dominio que se une a PSMA es un VHH.

En algunas modalidades, los dominios de unión de la primera porción comprenden secuencias proporcionadas en las Tablas 6a-6g, donde las Tablas 6a-e muestran secuencias que se unen a CD3 y las Tablas 6f-h muestran secuencias que se unen a PSMA; la secuencia de RS comprende una secuencia proporcionada en las Tablas 8a-8b (p. ej., como se describe en el presente documento); y el radical de enmascaramiento es un ELNN. En algunas modalidades, el radical de enmascaramiento es un ELNN que tiene al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia

con una secuencia que comprende el grupo de secuencias expuestas en las Tablas 3a-3b. En algunas modalidades, la composición es una proteína de fusión recombinante. En algunas modalidades, las porciones están conectadas mediante conjugación química.

En algunas modalidades, una composición de paTCE comprende la configuración de Fórmula IIIa (representada del extremo N-terminal al extremo C-terminal):

(quinta porción)-(cuarta porción)-(primera porción)-(segunda porción)-(tercera porción) (IIIa)

en donde la primera porción es una biespecífica que comprende dos dominios de unión a antígeno en donde el primer dominio de unión tiene afinidad de unión específica a un PSMA (p. ej., expresado en una célula cancerosa) y el segundo dominio de unión tiene afinidad de unión específica a CD3 (p. ej., expresado en una célula efectora); la segunda porción comprende un segmento de liberación (RS) susceptible de ser escindido por una proteasa de mamífero; y la tercera porción es un radical de enmascaramiento que sirve para enmascarar las propiedades biológicas del dominio del anticuerpo biespecífico; la cuarta porción comprende un segmento de liberación (RS) susceptible de ser escindido por una proteasa de mamífero que puede ser idéntica o diferente a la segunda porción; y la quinta porción es un radical de enmascaramiento que puede ser idéntico o diferente de la tercera porción.

En algunas modalidades en las que la primera porción comprende un dominio de unión que comprende un VHH y un dominio de unión que comprende un VL y VH, los dominios de unión de la primera porción pueden estar en el orden (VL-VH)1-(VHH)2, en donde “1” y “2” representan el primer y segundo dominios de unión,

respectivamente, o (VH-VL)1-(VHH)2, o (VHH)1-(VL-VH)2, o (VHH)1-(VH- VL)2, en donde los dominios de unión emparejados están conectados mediante un conector polipeptídico (p. ej., como se describe en el presente documento). En algunas modalidades en las que la primera porción comprende dos dominios de unión que comprenden cada uno de ellos un VL y VH, los dominios de unión de la primera porción pueden estar en el orden (VL-VH)1-(VL-VH)2, donde “1” y “2” representan el primer y segundo dominios de unión, respectivamente, o (VL-VH)1-(VH-VL)2, o (VH-VL)1-(VL-VH)2, o (VH-VL)1- (VH-VL)2, en donde los dominios de unión emparejados están conectados mediante un conector polipeptídico (p. ej., como se describe en el presente documento).

En algunas modalidades, el dominio que se une a PSMA es un VHH.

En algunas modalidades, los dominios de unión de la primera porción comprenden secuencias proporcionadas en las Tablas 6a-6g, en donde las Tablas 6a-e muestran secuencias que se unen a CD3 y las Tablas 6f-h muestran secuencias que se unen a PSMA; cada secuencia de RS comprende, individualmente, una secuencia proporcionada en las Tablas 8a-8b (p. ej., como se describe en el presente documento); y cada radical de enmascaramiento es, individualmente, un ELNN. En algunas modalidades, cada radical de enmascaramiento es un ELNN que tiene al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia que comprende el grupo de secuencias expuestas en las Tablas 3a-3b. En algunas modalidades, el paTCE es una proteína de fusión recombinante. En algunas modalidades, una o más porciones del paTCE están conectadas mediante conjugación química.

En el presente documento se proporcionan composiciones que proporcionan ventajosamente terapias biespecíficas dirigidas a PSMA que tienen más selectividad,

mayor semivida y dan como resultado menos toxicidad y menos efectos secundarios una vez que son escindidas por proteasas encontradas en los tejidos diana o tejidos que una enfermedad ha convertido en enfermos, de modo que las composiciones en cuestión tienen un índice terapéutico mejorado en comparación con las composiciones de anticuerpos biespecíficos conocidas en la técnica. Tales composiciones son útiles en el tratamiento del cáncer. En algunas modalidades, cuando un paTCE está cerca de un tejido o célula diana que porta o secreta una proteasa susceptible de escindir el RS, los dominios de unión biespecíficos se liberan de los ELNN mediante la acción de una o varias proteasas, eliminando una barrera de impedimento estérico y dejando al TCE más libre para ejercer su efecto farmacológico. Esta propiedad es particularmente ventajosa en el tratamiento de tumores inmunológicamente fríos que expresan PSMA. En algunas modalidades, un paTCE proporcionado en el presente documento se activa en un tejido diana, en donde el tejido diana es un tumor sólido de un órgano o sistema.

Dominios de unión

En algunas modalidades, un dominio de unión proporcionado en el presente documento comprende uno o más anticuerpos de longitud completa o uno o más fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos incluyen cualquier polipéptido de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado genéticamente que comprenda una porción o porciones de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo se pueden obtener, p. ej., de moléculas de anticuerpo completas utilizando cualquier técnica convencional adecuada, tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería

genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica dominios variables y opcionalmente constantes de anticuerpos. Los términos dominio de unión y dominio de anticuerpo se utilizan indistintamente en el presente documento.

En algunas modalidades, se utilizan dominios de unión de cadena sencilla, tales como, pero sin limitarse a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único, VHH, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla (scFv), y dianticuerpos capaces de unirse a ligandos o receptores asociados con células efectoras y antígenos de tejidos o células enfermos que son cánceres, tumores u otros tejidos malignos.

En algunas modalidades, el dominio de unión es un dominio de anticuerpo biespecífico, en donde el dominio de anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a una primera diana y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a una segunda diana. En algunas modalidades, el primer dominio de unión a antígeno es un primer fragmento de unión a antígeno (p. ej., un scFv o un ISVD, tal como un VHH) y el segundo dominio de unión a antígeno es un segundo fragmento de unión a antígeno (p. ej., un scFv o un ISVD, tal como un VHH).

En algunas modalidades, un fragmento de unión a antígeno (AF) (p. ej., un primer fragmento de unión a antígeno (AF1) y/o un segundo fragmento de unión a antígeno (AF2)) puede (cada uno independientemente) ser un fragmento de unión a antígeno quimérico, humanizado o humano. El fragmento de unión a antígeno (AF) (p. ej., un primer fragmento de unión a antígeno (AF1) y/o un segundo fragmento de unión a antígeno (AF2)) puede ser (cada uno independientemente) un Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, anticuerpo lineal, VHH o scFv.

En algunas modalidades, uno o ambos fragmentos de unión a antígeno (p. ej., el primer y/o segundo fragmentos de unión a antígeno) pueden configurarse como un (Fab')2 o un dianticuerpo de cadena sencilla. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión con especificidad de unión a un marcador de células cancerosas y un segundo dominio de unión con especificidad de unión a un antígeno de célula efectora. En algunas modalidades, el dominio de unión para la diana de células tumorales es un dominio variable de un receptor de células T que ha sido modificado genéticamente para unirse al MHC que está cargado con un fragmento peptídico de una proteína que está expresada en exceso por células tumorales.

En algunas modalidades, se diseña un paTCE teniendo en cuenta la ubicación de la proteasa del tejido diana, así como la presencia de la misma proteasa en tejidos sanos que no se pretende que sean elegidos como diana, así como la presencia del ligando diana en tejido sano, y una mayor presencia del ligando en el tejido diana enfermo, con el fin de proporcionar una amplia ventana terapéutica. Una “ventana terapéutica” se refiere a la diferencia entre la dosis mínima eficaz y la dosis máxima tolerada para una composición terapéutica determinada. En algunas modalidades, para ayudar a lograr una ventana terapéutica amplia para un TCE, los dominios de unión del TCE están protegidos por la proximidad de un radical o radicales de enmascaramiento (p. ej., ELNN) de modo que la afinidad de unión de la composición intacta por uno, o ambos ligandos se reduzca en comparación con la composición que ha sido escindida por una proteasa de mamífero, liberando así la primera porción de los efectos protectores del radical de enmascaramiento.

En algunas modalidades, un sitio de unión y reconocimiento de antígeno completo comprende un dímero de un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL). Dentro de cada cadena VH y VL hay tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL; las seis CDR de un dominio de unión confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo o dominio de unión de cadena sencilla. Las secuencias marco que flanquean las CDR tienen una estructura terciaria que se conserva esencialmente en las inmunoglobulinas nativas de todas las especies, y los restos del marco (FR) sirven para mantener las CDR en su orientación apropiada. En algunas modalidades, no se requiere un dominio constante para la función de unión, pero puede ayudar a estabilizar la interacción VH-VL. En algunas modalidades, un sitio de unión puede ser un par de dominios VH-VL, VH-VH o VL-VL de la misma o de diferentes inmunoglobulinas; sin embargo, generalmente se prefiere crear dominios de unión de cadena sencilla utilizando las respectivas cadenas VH y VL del anticuerpo parental. En algunas modalidades, el orden de los dominios VH y VL dentro de la cadena polipeptídica no es limitante, siempre que los dominios VH y VL estén dispuestos de manera que el sitio de unión a antígeno pueda plegarse adecuadamente. Por lo tanto, En algunas modalidades, los dominios de unión de cadena sencilla que comprenden un VH y un VL (p. ej., en un scFv) pueden tener el VH y el VL dispuestos como VL-VH o VL-VH.

En algunas modalidades, la disposición de las cadenas V puede ser VH(antígeno de superficie de células cancerosas)-VL(antígeno de superficie de células cancerosas)-VL(antígeno de células efectoras)-VH(antígeno de células efectoras), VH(antígeno de superficie de células cancerosas)-VL(antígeno de superficie de

células cancerosas)-VH(antígeno de células efectoras)-VL(antígeno de células efectoras), VL(antígeno de superficie de células cancerosas)-VH(antígeno de superficie de células cancerosas)-VL(antígeno de células efectoras)-VH(antígeno de células efectoras)), VL(antígeno de superficie de células cancerosas)-VH(antígeno de superficie de células cancerosas)-VH(antígeno de células efectoras)-VL(antígeno de células efectoras), VHH(antígeno de superficie de células cancerosas)-VH(antígeno de células efectoras)-VL(antígeno de células efectoras), VHH(antígeno de superficie de células cancerosas)-VL(antígeno de células efectoras)-VH(antígeno de células efectoras), VL(antígeno de superficie de células cancerosas)-VH(antígeno de superficie de células cancerosas)-VHH(antígeno de células efectoras), o VH (antígeno de superficie de células cancerosas)-VL (antígeno de superficie de células cancerosas)-VHH (antígeno de células efectoras).

En algunas modalidades, son posibles los siguientes órdenes: VH(antígeno de células efectoras)-VL(antígeno de células efectoras)-VL(antígeno de superficie de células cancerosas)-VH(antígeno de superficie de células cancerosas), VH(antígeno de células efectoras)-VL(antígeno de células efectoras)-VH(antígeno de la superficie de células cancerosas)-VL(antígeno de la superficie de células cancerosas), VL(antígeno de las células efectoras)-VH(antígeno de las células efectoras)-VL(antígeno de la superficie de células cancerosas)-VH(antígeno de la superficie de células cancerosas), VL(antígeno de células efectoras)-VH(antígeno de células efectoras)-VH(antígeno de superficie de células cancerosas)-VL(antígeno de superficie de células cancerosas), VHH(antígeno de células efectoras)-VH(antígeno de superficie de células cancerosas)-VL(antígeno de superficie de células cancerosas), VHH(antígeno de células efectoras)-

VL(antígeno de superficie de células cancerosas)-VH(antígeno de superficie de células cancerosas), VL(antígeno de células efectoras)-VH(antígeno de células efectoras)-VHH(antígeno de superficie de células cancerosas) o VH(antígeno de células efectoras)-VL(antígeno de células efectoras)-VHH(antígeno de superficie de células cancerosas).

Como se emplean en el presente documento, “N-terminalmente con respecto a” o “C-terminalmente con respecto a” y sus variantes gramaticales denotan una ubicación relativa dentro de la secuencia de aminoácidos primaria en lugar de una ubicación en el extremo N-terminal o C-terminal absoluto del anticuerpo biespecífico de cadena sencilla. Por lo tanto, como ejemplo no limitante, un primer dominio de unión que está “ubicado C-terminalmente con respecto a” un segundo dominio de unión denota que la primera unión está ubicada en el lado carboxilo del segundo dominio de unión dentro de un anticuerpo de cadena sencilla biespecífico, y no excluye la posibilidad de que una secuencia adicional, por ejemplo un conector y/o un ELNN, una etiqueta His u otro compuesto tal como un radioisótopo, esté ubicado en el extremo C-terminal del anticuerpo monocatenario biespecífico.

En algunas modalidades, un paTCE comprende una primera porción que comprende un primer dominio de unión y un segundo dominio de unión en donde cada uno de los dominios de unión es un scFv y en donde cada scFv comprende un VL y un VH. En algunas modalidades, las composiciones de paTCE comprenden una primera porción que comprende un primer dominio de unión y un segundo dominio de unión en donde uno de los dominios de unión es un scFV y el otro dominio de unión es un VHH. En algunas modalidades, el dominio de unión a CD3 puede ser un scFV (que comprende, por ejemplo, una secuencia mostrada en

cualquiera de las Tablas 6a-e) y el segundo dominio de unión es un VHH que se une a PSMA. En algunas modalidades, un paTCE comprende una primera porción que comprende un primer dominio de unión y un segundo dominio de unión en donde los dominios de unión están en una configuración de dianticuerpo y en donde un dominio comprende una región VHH y el otro dominio comprende una región VL y una región VH. En la Tabla 6f se muestran dominios de unión a VHH de unión a PSMA ilustrativos. En algunas modalidades, un paTCE comprende una primera porción que comprende un primer dominio de unión y un segundo dominio de unión en donde los dominios de unión están en una configuración de dianticuerpo y en donde cada dominio comprende una región VL y una región VH. Se pueden obtener regiones VH y VL de unión a PSMA ilustrativas a partir de las secuencias que se muestran en la Tabla 6g.

En ejemplos no limitantes, un TCE puede comprender una secuencia que muestra al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia, o alternativamente 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de anticuerpo identificada en el presente documento. En algunas modalidades, un TCE comprende una secuencia biespecífica (p. ej., un BsAb) que comprende un primer dominio de unión y un segundo dominio de unión, en donde el primer dominio de unión tiene afinidad de unión específica a un marcador específico de tumor o un antígeno de célula cancerosa, y muestra al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia, o alternativamente 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia para emparejarse con una secuencia de VHH de un anticuerpo anti-PSMA divulgada en el presente

documento en la Tabla 6f o secuencias de VL y VH emparejadas de un anticuerpo anti-PSMA divulgado en el presente documento en la Tabla 6g; y en donde el segundo dominio de unión tiene afinidad de unión específica a una célula efectora, y muestra al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia, o alternativamente 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con las secuencias de VL y VH emparejadas de un anticuerpo anti-CD3 divulgado en el presente documento en cualquiera de las Tablas 6a-e.

En algunas modalidades, un TCE puede comprender un dominio de unión (p. ej., una secuencia de aminoácidos de VH y/o VL) de, o derivado de, un anticuerpo anti-CD3. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-CD3 incluyen OKT3 (también llamado muromonab) y anticuerpo monoclonal anti-CD3 humanizado (hOKT31(Ala-Ala))(KC Herold et al., New England Journal de Medicine 346:1692-1698. 2002), así como fragmentos y derivados de los mismos que se unen selectivamente a CD3. Se describen ejemplos adicionales en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.885.573; 6.491.916; y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2021/0054077-A1, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia. Los ejemplos adicionales no limitantes de secuencias de anticuerpos anti-CD3 incluyen las de pasotuxizumab (también conocido como AMG-212) y acapatamab (también conocido como AMG-160).

En algunas modalidades, un TCE puede comprender un dominio de unión (p. ej., una secuencia de aminoácidos de VH y/o VL) de, o derivado de, un anticuerpo anti-PSMA. Los ejemplos no limitantes de secuencias de anticuerpos anti-PSMA incluyen las de pasotuxizumab y acapatamab.

En algunas modalidades, el TCE es pasotuxizumab. En algunas modalidades, el TCE es acapatamab.

La presente divulgación proporciona dominios variables únicos (ISVD) de inmunoglobulina que se unen a PSMA. La presente divulgación proporciona adicionalmente ácidos nucleicos que codifican los ISVD o polipéptidos, así como vectores, anfitriones y métodos para producir estos ISVD o polipéptidos. También se proporcionan polipéptidos multiespecíficos que comprenden un ISVD según la presente divulgación y al menos dominio de unión a CD3, incluidos paTCE. Se incluyen métodos para el tratamiento que hacen uso de los ISVD o polipéptidos según la presente divulgación. En algunas modalidades, el ISVD es un ISVD de cadena pesada. En algunas modalidades, el ISVD es un VHH, un VHH humanizado o un VH camelizado.

En algunas modalidades, el ISVD es un VHH.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el ISVD o polipéptido de la presente divulgación o un vector que comprende el ácido nucleico.

La presente divulgación también se refiere a un anfitrión no humano o una célula anfitriona transformada o transfectada con el ácido nucleico o vector que codifica un ISVD o polipéptido divulgado en el presente documento.

La presente divulgación se refiere además a composiciones que comprenden un ISVD o polipéptido divulgado en el presente documento, tal como una composición farmacéutica.

En el presente documento se incluye un método para producir un ISVD o polipéptido como se divulga en el presente documento, comprendiendo el método las etapas de:

a. expresar, en una célula anfitriona u organismo anfitrión o en otro sistema de expresión, una secuencia de ácido nucleico que codifica el ISVD o polipéptido; opcionalmente seguido de:

b. aislar y/o purificar el ISVD o polipéptido.

Se proporcionan en el presente documento composiciones y polipéptidos que comprenden un ISVD para su uso como medicamento. En algunas modalidades, el polipéptido o la composición se van a utilizar en el tratamiento de una enfermedad proliferativa. En algunas modalidades, la enfermedad proliferativa es cáncer.

La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento que comprende la etapa de administrar una composición o polipéptido que comprenden un ISVD a un sujeto que lo necesite. En algunas modalidades, el método de tratamiento es para tratar una enfermedad proliferativa. En algunas modalidades, la enfermedad proliferativa es cáncer.

En el presente documento se incluyen composiciones y polipéptidos que comprenden un ISVD para su uso en la preparación de un medicamento. En algunas modalidades, el medicamento se utiliza en el tratamiento de una enfermedad proliferativa. En algunas modalidades, la enfermedad proliferativa es cáncer.

El término “dominio variable único de inmunoglobulina” (ISVD) define moléculas de inmunoglobulina en las que el sitio de unión a antígeno está presente y formado por un único dominio de inmunoglobulina. Esto diferencia los dominios variables únicos de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas “convencionales” (p. ej., anticuerpos monoclonales) o sus fragmentos (tales como Fab, Fab', F(ab')2, scFv, dis-scFv), en donde dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables, interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. Típicamente, en las

inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) tanto de VH como de VL contribuirán al sitio de unión a antígeno, es decir, estarán implicadas un total de 6 CDR en la formación del sitio de unión a antígeno, mientras que en un ISVD sólo 3 CDR de un único dominio contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno.

En vista de la definición anterior, el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo convencional de 4 cadenas (tal como una molécula de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE; conocidas en la técnica) o de un fragmento Fab, un fragmento F(ab')2, un fragmento Fv tal como un Fv conectado por disulfuro o un fragmento scFv, o un dianticuerpo (todos conocidos en la técnica) derivados de tal anticuerpo de 4 cadenas convencional, normalmente no se consideraría como un dominio variable único de inmunoglobulina, ya que, en estos casos, la unión al epítopo respectivo de un antígeno normalmente no se produciría mediante un (único) dominio de inmunoglobulina sino mediante un par de dominios de inmunoglobulina (asociados), tales como dominios variables de cadena ligera y pesada, es decir, mediante un par VH-VL de dominios de inmunoglobulina, que se unen conjuntamente a un epítopo del antígeno respectivo.

Por el contrario, los dominios variables únicos de inmunoglobulina son capaces de unirse específicamente a un epítopo del antígeno sin emparejarse con un dominio variable de inmunoglobulina adicional. El sitio de unión de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por un solo dominio VH, un solo VHH o un solo VL.

Como tal, el dominio variable único puede ser una secuencia de dominio variable de cadena ligera (p. ej., una secuencia de VL) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia del dominio variable de cadena pesada (p. ej., una secuencia de VH o una secuencia de VHH) o un fragmento adecuado de la misma; siempre que sea susceptible de formar una única unidad de unión a antígeno (es decir, una unidad de unión a antígeno funcional que consiste esencialmente en un único dominio variable, de modo que el único dominio de unión a antígeno no necesite interactuar con otro dominio variable para formar una unidad de unión a antígeno funcional).

Un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) puede ser, por ejemplo, un ISVD de cadena pesada, tal como un VH, VHH, incluido un VH camelizado o un VHH humanizado. En algunas modalidades, es un VHH, incluido un VH camelizado o un VHH humanizado. Los ISVD de cadena pesada se pueden obtener de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o de un anticuerpo de cadena pesada.

Por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un anticuerpo de dominio único (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para utilizar como anticuerpo de dominio único), un “dAb” o dAb (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para su uso como dAb); otros dominios variables únicos, o cualquier fragmento adecuado de cualquiera de los mismos.

En algunas modalidades, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser una molécula de NANOBODY® o un fragmento de unión a antígeno adecuado de la misma. NANOBODY® es una marca registrada de Ablynx N.V.

Los “dominios VHH”, también conocidos como VHH, regiones VHH, fragmentos de anticuerpos VHH y anticuerpos VHH, se han descrito originalmente como el dominio variable de inmunoglobulina de unión a antígeno de “anticuerpos de

cadena pesada" (*es decir*, de "anticuerpos desprovistos de cadenas ligeras"; Hamers-Casterman *et al*., Nature 363: 446-448, 1993). El término "dominio VHH" se ha elegido para distinguir estos dominios variables de los dominios variables de cadena pesada que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (a los que se hace referencia en el presente documento como "dominios VH", "regiones VH" y "VH") y de los dominios variables de cadena ligera que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (a los que se hace referencia en el presente documento como "dominios VL", "regiones VL" y "VL"). Para una descripción más detallada de los VHH, se hace referencia al artículo de revisión de Muyldermans (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001).

Típicamente, la generación de inmunoglobulinas implica la inmunización de animales de experimentación, la fusión de células productoras de inmunoglobulinas para crear hibridomas y el escrutinio de las especificidades deseadas. Alternativamente, se pueden generar inmunoglobulinas mediante el escrutinio de bibliotecas sintéticas o sin exposición previa, p. ej., mediante presentación en fagos.

La generación de secuencias de inmunoglobulinas se ha descrito ampliamente en diversas publicaciones, entre las cuales se pueden ilustrar el documento WO 94/04678, Hamers-Casterman *et al*. 1993 y Muyldermans *et al*. 2001. En estos métodos, los camélidos se inmunizan con el antígeno diana para inducir una respuesta inmunitaria contra el antígeno diana. El repertorio de VHH obtenidos de la inmunización se escruta adicionalmente en busca de VHH que se unen al antígeno diana.

En estos casos, la generación de anticuerpos requiere antígeno purificado para la inmunización y/o escrutinio. Los antígenos pueden purificarse a partir de fuentes naturales o mediante producción recombinante.

La inmunización y/o el escrutinio de secuencias de inmunoglobulinas se pueden realizar utilizando fragmentos peptídicos de tales antígenos.

La presente tecnología puede utilizar secuencias de inmunoglobulinas de diferentes orígenes, que comprenden secuencias de inmunoglobulinas de ratón, rata, conejo, burro, humanas y de camélido. La tecnología también incluye secuencias totalmente humanas, humanizadas o quiméricas. Por ejemplo, la tecnología comprende secuencias de inmunoglobulina de camélido y secuencias de inmunoglobulina de camélido humanizadas, o anticuerpos de dominios camelizados, *p. ej*. dAb camelizado como describen Ward e*t al*. (véanse, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994 y 1996)). En algunas modalidades, la tecnología también utiliza secuencias de inmunoglobulinas fusionadas, p. ej., que forman una construcción multivalente y/o multiespecífica (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios VHH y su preparación, también se hace referencia a Conrath *et al*., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001, así como por ejemplo a los documentos WO 96/34103 y WO 99/23221), y secuencias de inmunoglobulinas que comprenden etiquetas u otros radicales funcionales, *p. ej*., toxinas, marcas, agentes radioquímicos, etc., que se pueden obtener a partir de las secuencias de inmunoglobulinas de la presente tecnología.

Un “VHH humanizado” comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio VHH de origen natural, pero que ha sido “humanizado”, *es decir*, reemplazando uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de VHH de origen natural (y en particular

en las secuencias marco) por uno o más de los restos de aminoácidos que se encuentran en la posición o posiciones correspondientes en un dominio VH de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano (*p. ej.*, indicado anteriormente). Esto se puede realizar de una manera conocida per se, que quedará clara para el experto en la técnica, por ejemplo, basándose en la descripción adicional del presente documento y en la técnica anterior (*p. ej.*, documento WO 2008/020079). Nuevamente, cabe señalar que tales VHH humanizados se pueden obtener de cualquier manera adecuada conocida per se y, por lo tanto, no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido utilizando un polipéptido que comprende un dominio VHH de origen natural como material de partida.

Un “VH camelizado” comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de origen natural, pero que ha sido “camelizada”, es decir, reemplazando uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de origen natural de un anticuerpo de 4 cadenas convencional por uno o más de los restos de aminoácidos que se encuentran en la posición o posiciones correspondientes en un dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada. Esto se puede realizar de una manera conocida per se, que quedará clara para el experto en la técnica, por ejemplo, basándose en la descripción adicional del presente documento y en la técnica anterior (p. ej., documento WO 2008/020079). Tales sustituciones “camelizantes” se insertan preferiblemente en posiciones de aminoácidos que forman y/o están presentes en la interfase VH-VL, y/o en los llamados restos distintivos de Camelidae, como se define en el presente documento (véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994 y 1996), más arriba). En algunas modalidades, la secuencia de VH que se utiliza como material de partida o punto

de partida para generar o diseñar el VH camelizado es preferiblemente una secuencia de VH de un mamífero, p. ej., la secuencia de VH de un ser humano, tal como una secuencia VH3. Sin embargo, cabe señalar que tal VH camelizado se pueden obtener de cualquier manera adecuada conocida per se y, por lo tanto, no se limita estrictamente a polipéptidos que se han obtenido utilizando un polipéptido que comprende un dominio VH de origen natural como material de partida.

En algunas modalidades, se puede considerar que la estructura de una secuencia de dominio variable único de inmunoglobulina está compuesta por cuatro regiones marco ("FR"), a las que se hace referencia en la técnica y en el presente documento como "Región marco 1" ("FR1"); como "Región marco 2" ("FR2"); como "Región marco 3" ("FR3"); y como "Región Marco 4" ("FR4"), respectivamente; cuyas regiones marco están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad ("CDR"), a las que se hace referencia en la técnica y en el presente documento como "Región Determinante de Complementariedad 1" ("CDR1"); como "Región Determinante de la Complementariedad 2" ("CDR2"); y como "Región Determinante de Complementariedad 3" ("CDR3"), respectivamente. Como se describe con más detalle en el párrafo q) en las páginas 58 y 59 del documento WO 08/020079, los restos de aminoácidos de un dominio variable único de inmunoglobulina se pueden numerar según la numeración general para dominios VH proporcionada por Kabat et al. ("Secuencia de Proteins de Immunological Interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publicación No. 91), tal como se aplica a los dominios VHH de camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans, 2000 (J. Immunol. Methods 240 (1-2): 185-195; véase por ejemplo la Figura 2 de esta publicación). Cabe señalar que - como es bien conocido en la técnica para los dominios

VH y para los dominios VHH - el número total de restos de aminoácidos en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de restos de aminoácidos indicado por la Numeración de Kabat (es decir, una o más posiciones según la numeración de Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más restos de aminoácidos que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, en general, la numeración según Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los restos de aminoácidos en la secuencia real. En algunas modalidades, el número total de restos de aminoácidos en un dominio VH y un dominio VHH está en el rango de 110 a 135. Sin embargo, cabe señalar que también pueden ser adecuadas secuencias más pequeñas y más largas para los fines descritos en el presente documento.

La determinación de las regiones CDR también se puede realizar según diferentes métodos.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR de VHH se determinaron según la definición de AbM como describe Martin 2010 (en: Kontermann y Dübel (Eds.) 2010, Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Capítulo 3, pág. 33-51). Según este método, FR1 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 1-25, CDR1 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 26-35, FR2 comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 50- 58, FR3 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 59-94, CDR3 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 95-102 y FR4 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR se determinan según Kabat (Martin 2010, en: Kontermann and Dübel (eds.), Antibody Engineering Vol. 2,

Springer Verlag Heidelberg Berlin, Capítulo 3, pág. 33-51). Según este método, FR1 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 1-30, CDR1 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 31-35, FR2 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 50-65, FR3 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 66-94, CDR3 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 95-102, y FR4 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

En algunas modalidades, FR1 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 1-25, CDR1 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 26-35, FR2 comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 50-58, FR3 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 59-94, CDR3 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 93-102 y FR4 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

En algunas modalidades, FR1 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 1-25, CDR1 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 26-35, FR2 comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 50-58, FR3 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 59-94, CDR3 comprende los restos de aminoácidos

en las posiciones 93-102 y FR4 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 103-126.

En tal secuencia de inmunoglobulina, las secuencias marco pueden ser cualquier secuencia marco adecuada, y los ejemplos de secuencias marco adecuadas quedarán claros para el experto, por ejemplo, basándose en los manuales convencionales y la divulgación y referencias adicionales mencionadas en el presente documento.

En algunas modalidades, las secuencias marco son una combinación adecuada de secuencias marco de inmunoglobulinas o secuencias marco que se han obtenido de secuencias marco de inmunoglobulinas (por ejemplo, mediante humanización o camelización). Por ejemplo, las secuencias marco pueden ser secuencias marco derivadas de un dominio variable de cadena ligera (p. ej., una secuencia de VL) y/o de un dominio variable de cadena pesada (p. ej., una secuencia de VH o una secuencia de VHH). En algunas modalidades, las secuencias marco son secuencias marco que se han obtenido de una secuencia de VHH (en la que las secuencias marco pueden opcionalmente haber sido parcial o totalmente humanizadas) o son secuencias de VH convencionales que han sido camelizadas (como se define en el presente documento).

En algunas modalidades, las secuencias marco presentes en la secuencia de ISVD utilizadas en la tecnología pueden contener uno o más restos distintivos (como se definen en el presente documento), de modo que la secuencia de ISVD sea un VHH, incluido un VHH humanizado o un VH camelizado. Algunos ejemplos no limitantes de (combinaciones adecuadas de) tales secuencias marco quedarán claros a partir de la divulgación adicional del presente documento.

Nuevamente, como se describe generalmente en el presente documento para las secuencias de inmunoglobulina, también es posible utilizar fragmentos adecuados (o combinaciones de fragmentos) de cualquiera de los anteriores, tales como

fragmentos que contienen una o más secuencias de CDR, adecuadamente flanqueadas por y/o conectadas a través de una o más secuencias marco (por ejemplo, en el mismo orden que estas CDR y las secuencias marco pueden aparecer en la secuencia de inmunoglobulina de tamaño completo de la que se ha obtenido el fragmento).

Sin embargo, cabe señalar que la tecnología no está limitada en cuanto al origen de la secuencia de ISVD (o de la secuencia de nucleótidos utilizada para expresarla), ni en cuanto a la forma en que la secuencia de ISVD o la secuencia de nucleótidos es (o ha sido) generada u obtenida. Por tanto, las secuencias de ISVD pueden ser secuencias de origen natural (de cualquier especie adecuada) o secuencias sintéticas o semisintéticas. En un aspecto específico pero no limitante, la secuencia de ISVD es una secuencia natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia sintética o semisintética, que incluye, pero sin limitarse a, secuencias de inmunoglobulina “humanizadas” (como se divulga en el presente documento) (tales como secuencias de inmunoglobulina de ratón o conejo parcial o totalmente humanizadas, y en particular secuencias VHH parcial o totalmente humanizadas), secuencias de inmunoglobulinas “camelizadas” (como se divulga en el presente documento), así como secuencias de inmunoglobulinas que se han obtenido mediante técnicas tales como maduración de la afinidad (por ejemplo, a partir de secuencias de inmunoglobulinas sintéticas, aleatorias o de origen natural), injerto de CDR, remodelación de la superficie, combinación de fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulinas, ensamblaje por PCR utilizando cebadores solapantes y técnicas similares para modificar genéticamente secuencias de inmunoglobulinas

bien conocidas por el experto en la técnica; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de los anteriores.

De manera similar, las secuencias de nucleótidos pueden ser secuencias de nucleótidos de origen natural o secuencias sintéticas o semisintéticas, y pueden ser, por ejemplo, secuencias que se aíslan mediante PCR a partir de un molde adecuado de origen natural (p. ej., ADN o ARN aislados de una célula), secuencias de nucleótidos que se han aislado de una biblioteca (y en particular, una biblioteca de expresión), secuencias de nucleótidos que se han preparado introduciendo mutaciones en una secuencia de nucleótidos de origen natural (utilizando cualquier técnica adecuada conocida per se, tal como PCR de emparejamiento erróneo), secuencias de nucleótidos que se han preparados mediante PCR utilizando cebadores solapantes, o secuencias de nucleótidos que se han preparado utilizando técnicas de síntesis de ADN conocidas per se.

Como se describió anteriormente, un ISVD puede ser un ISVD o un fragmento adecuado del mismo. Para obtener una descripción general de los ISVD, se hace referencia a la descripción adicional siguiente, así como a las referencias citadas en el presente documento. A este respecto, cabe señalar, sin embargo, que esta descripción y la técnica anterior describían principalmente ISVD de la denominada “clase VH3” (es decir, ISVD con un alto grado de homología de secuencia con secuencias de la línea germinal humana de la clase VH3 tales como DP-47, DP-51 o DP-29). Sin embargo, cabe señalar que la tecnología en su sentido más amplio generalmente puede utilizar cualquier tipo de ISVD y, por ejemplo, también utiliza los ISVD que pertenecen a la llamada “clase VH4” (es decir, ISVD con un alto grado de homología de secuencia con la línea germinal humana de la clase VH4 tales como DP-78), como se describe por ejemplo en el documento WO 2007/118670.

Generalmente, los ISVD (en particular secuencias VHH, incluidas secuencias VHH (parcialmente) humanizadas y secuencias de VH camelizadas) pueden caracterizarse por la presencia de uno o más “restos distintivos” (como se describe en el presente documento) en una o más de las secuencias marco (de nuevo como se describe más detalladamente en el presente documento). Por tanto, en general, un ISVD puede definirse como una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que uno o más de los Restos distintivos son los definidos adicionalmente en el presente documento.

En algunas modalidades, un ISVD puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que las secuencias marco son las definidas adicionalmente en el presente documento.

En algunas modalidades, un ISVD puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que uno o más de los restos de aminoácidos en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se seleccionan entre los Restos distintivos mencionados en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5: Restos distintivos en los ISVD

Posición	**V_H3 Humano**	**Restos Distintivos**
11	L, V; predominantemente L	L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; preferiblemente L
37	V, I, F; usualmente V	F(1), Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, preferiblemente F(1) o Y
44(8)	G	E(3), q(3), g(2), d, a, k, r, l, p, s, v, h, t, n, w, m, i; Preferiblemente g(2), e(3) o q(3); lo más preferiblemente g(2) o q(3).
45(8)	L	L(2), R(3), P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; preferiblemente L(2) o R(3)
47(8)	W, Y	F(1), L(1) o W(2) G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; preferiblemente W(2), L(1) o F(1)
83	R o K; usualmente R	R, K(5), T, E(5), Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; preferiblemente K o R; lo más preferiblemente K
84	A, T, D; predominantemente A	P(5), S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; preferiblemente P
103	W	W(4), R(6), G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P(6), E, C; preferiblemente W
104	G	G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; preferiblemente G
108	L, M o T; predominantemente L	Q, L(7), R, P, E, K, S, T, M, A, H; preferiblemente Q o L(7)
Notas: (1) En particular, pero no exclusivamente, combinado con KERE o KQRE en las posiciones 43-46. (2) Usualmente como GLEW en las posiciones 44-47. (3) Usualmente como KERE o KQRE en las posiciones 43-46, p. ej., como KEREL, KEREF, KQREL, KQREF, KEREG, KQREW o KQREG en las posiciones 43-47. Alternativamente también son posibles secuencias tales como TERE (por ejemplo TEREL), TQRE (por ejemplo TQREL), KECE (por ejemplo KECEL o KECER), KQCE (por ejemplo KQCEL), RERE (por ejemplo REREG), RQRE (por ejemplo RQREL, RQREF o RQREW), QERE (por ejemplo QEREG), QQRE, (por ejemplo		

QQREW, QQREL o QQREF), KGRE (por ejemplo KGREG), KDRE (por ejemplo KDREV). Algunas otras secuencias posibles, pero menos preferidas, incluyen, por ejemplo, DECKL y NVCEL.

(4) Con GLEW en las posiciones 44-47 y KERE o KQRE en las posiciones 43-46.

(5) A menudo como KP o EP en las posiciones 83-84 de dominios VHH de origen natural.

(6) En particular, pero no exclusivamente, combinado con GLEW en las posiciones 44-47.

(7) Con la condición de que cuando las posiciones 44-47 sean GLEW, la posición 108 sea siempre Q en secuencias VHH (no humanizadas) que también contengan un W en 103.

(8) El grupo GLEW también contiene secuencias similares a GLEW en las posiciones 44-47, tales como por ejemplo GVEW, EPEW, GLER, DQEW, DLEW, GIEW, ELEW, GPEW, EWLP, GPER, GLER y ELEW.

En algunas modalidades, la tecnología proporcionada en el presente documento utiliza ISVD que pueden unirse a PSMA. En el contexto de la presente tecnología, "que se une a" una determinada molécula diana tiene el significado habitual en la técnica tal como se entiende en el contexto de los anticuerpos y sus respectivos antígenos.

En algunas modalidades, un ISVD (tal como un VHH) o un polipéptido multiespecífico-multivalente muestra una menor unión por anticuerpos preexistentes en el suero humano. Con este fin, En algunas modalidades, el polipéptido muestra una valina (V) en la posición de aminoácido 11 y una leucina (L) en la posición de aminoácido 89 (según la numeración de Kabat) en un ISVD. Por ejemplo, la siguiente secuencia:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA**E**DTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549)

se puede modificar para que sea la siguiente secuencia:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA**L**DTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS(SEQ ID NO: 566)

En algunas modalidades, el polipéptido muestra una extensión de 1 a 5 aminoácidos (preferiblemente de origen natural), tal como una única extensión de alanina (A), en el extremo C-terminal de un ISVD (p. ej., un ISVD C-terminal de una proteína de fusión o un ISVD que no está fusionado a ningún otro polipéptido). El extremo C-terminal de un ISVD es normalmente VTVSS (SEQ ID NO: 574). Por ejemplo, la siguiente secuencia:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS
WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR
TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549),

se puede modificar para que sea una cualquiera de las siguientes secuencias:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS
WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR
TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS**A** (SEQ ID NO: 567),

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS
WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR
TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS**AA** (SEQ ID NO: 568),

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS
WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR
TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS**AAA** (SEQ ID NO: 569),

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS
WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR
TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS**AAAA** (SEQ ID NO: 570), o

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS
WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR
TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS**AAAAA** (SEQ ID NO: 571).

En algunas modalidades, el polipéptido presenta una lisina (K) o glutamina (Q) en la posición 110 (según la numeración de Kabat) en al menos un ISVD.

Por ejemplo, la siguiente secuencia:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS
WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR
TWYD**F**NESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549)

se puede modificar para que sea una cualquiera de las siguientes secuencias:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS
WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR
TWYD**K**NESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 572) o

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS
WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR
TWYD**Q**NESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 573).

En algunas modalidades, el ISVD presenta una lisina (K) o glutamina (Q) en la posición 112 (según la numeración de Kabat) in al menos un ISVD. En estas modalidades, el extremo C-terminal del ISVD es VKVSS (SEQ ID NO: 575), VQVSS (SEQ ID NO: 576), VTVKS (SEQ ID NO: 577), VTVQS (SEQ ID NO: 578), VKVKS (SEQ ID NO: 579), VKVQS (SEQ ID NO: 580), VQVKS (SEQ ID NO: 581), o VQVQS (SEQ ID NO: 582) de manera que después de la adición de una sola alanina el extremo C-terminal del polipéptido por ejemplo presenta la secuencia VTVSSA (SEQ ID NO: 583), VKVSSA (SEQ ID NO: 584), VQVSSA (SEQ ID NO: 585), VTVKSA (SEQ ID NO: 586), VTVQSA (SEQ ID NO: 587), VKVKSA (SEQ ID NO: 588), VKVQSA (SEQ ID NO: 589), VQVKSA (SEQ ID NO: 590), o VQVQSA (SEQ ID NO: 591), preferiblemente VTVSSA (SEQ ID NO: 583).

En algunas modalidades, el polipéptido presenta una valina (V) en la posición de aminoácido 11 y una leucina (L) en la posición de aminoácido 89 (según la numeración de Kabat) en al menos el ISVD C-terminal, opcionalmente una lisina (K) o glutamina (Q) en la posición 110 (según la numeración de Kabat) en al menos un ISVD, y presenta una extensión de 1 a 5 aminoácidos (preferiblemente de origen natural), tal como una extensión de una sola alanina (A), en el extremo C-terminal del ISVD C-terminal (de manera que el extremo C-terminal del polipéptido por ejemplo consiste en la secuencia VTVSSA (SEQ ID NO: 583), VKVSSA (SEQ ID NO: 584) o VQVSSA (SEQ ID NO: 585), preferiblemente VTVSSA (SEQ ID NO: 583)). Véanse p. ej., los documentos WO2012/175741 y WO2015/173325 para información adicional a este respecto.

Como quedará claro a partir de la descripción adicional anterior y en el presente documento, los ISVD de la presente tecnología se pueden utilizar como “bloques de construcción” para formar polipéptidos de la presente tecnología, p. ej., combinándolos adecuadamente con otros grupos, restos, radicales o unidades de unión, con el fin de formar compuestos o proteínas de fusión como se describe en el presente documento (tales como, sin limitaciones, los polipéptidos bi-/tri-/tetra-/multivalentes y bi-/tri-/tetra-/multiespecíficos de la presente tecnología descrita en el presente documento), que combinan dentro de una molécula una o más propiedades o funciones biológicas deseadas. Un polipéptido con múltiples ISVD también se denomina “construcción de ISVD” o “formato de ISVD”.

Los términos “especificidad”, “se une específicamente” o “unión específica” se refieren al número de moléculas diana diferentes, tales como antígenos, del mismo organismo al que se puede unir una unidad de unión particular, tal como un ISVD (p. ej., un VHH) o un scFv, una afinidad suficientemente alta (véase más

abajo). “Especificidad”, “que se une específicamente” o “unión específica” se utilizan indistintamente en el presente documento con “selectividad”, “que se une selectivamente” o “unión selectiva”. Las unidades de unión, tales como los VHH y los scFv, preferiblemente se unen específicamente a sus dianas designadas.

La especificidad/selectividad de una unidad de unión se puede determinar en función de la afinidad. La afinidad denota la fuerza o estabilidad de una interacción molecular. La afinidad comúnmente viene dada por la K_D, que se expresa en unidades de mol/litro (o M).

La afinidad es una medida de la fuerza de unión entre un radical y un sitio de unión sobre la molécula objetivo: cuanto menor sea el valor de K_D, más fuerte será la fuerza de unión entre una molécula diana y un radical de direccionamiento.

Típicamente, las unidades de unión utilizadas en la tecnología actual (tales como ISVD o scFv) se unirán a sus dianas con una K_D de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro.

En algunas modalidades, un valor de K_D superior a 10^{-4} mol/litro se considera no específico. En algunas modalidades, un valor de K_D inferior a 10^{-4} mol/litro se considera específico.

Las K_D para interacciones biológicas, tales como la unión de secuencias de anticuerpos a un antígeno, que se consideran específicas, están típicamente en el rango de 10.000 nM o 10 µM a 0,001 nM o 1 pM o menos.

En consecuencia, una unión específica/selectiva puede significar que – utilizando el mismo método de medición, p. ej., SPR – una unidad de unión (o polipéptido que la comprende) se une a PSMA con un valor de K_D de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos y se une a diferentes dianas con un valor de K_D superior a 10^{-4} moles/litro.

Por lo tanto, el ISVD muestra preferiblemente al menos la mitad de la afinidad de unión, p. ej., al menos la misma afinidad de unión, al PSMA humano en comparación con un ISVD que consiste en la secuencia de aminoácidos de QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAM SWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYG RTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549), en donde la afinidad de unión se mide utilizando el mismo método, tal como SPR.

La unión específica a una determinada diana de una determinada especie no excluye que la unidad de unión también pueda unirse específicamente a la diana análoga de una especie diferente. Por ejemplo, la unión específica al PSMA humano no excluye que la unidad de unión (o un polipéptido que la comprende) también pueda unirse específicamente al PSMA de monos cinomolgos.

La unión específica de una unidad de unión a su diana designada se puede determinar de cualquier manera adecuada conocida per se, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitivos, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competición tipo sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas per se en la técnica; así como otros mecanismos mencionados en el presente documento.

La constante de disociación puede ser, p. ej., la constante de disociación real o aparente, como quedará claro para el experto en la técnica. Los métodos para determinar la constante de disociación serán claros para el experto en la técnica y, por ejemplo, incluyen los mecanismos mencionados a continuación.

La afinidad de una interacción molecular entre dos moléculas se puede medir mediante diferentes técnicas conocidas per se, tales como la conocida técnica del biosensor de resonancia de plasmón de superficie (SPR) (véase, por ejemplo, Ober

et al. 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559). El término “resonancia de plasmón de superficie”, como se emplea en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, donde una molécula está inmovilizada en el chip biosensor y la otra molécula pasa sobre la molécula inmovilizada en condiciones de flujo, lo que produce mediciones de k_{on}, k_{off} y, por tanto, valores de K_D. Esto se puede realizar, por ejemplo, utilizando el conocido sistema BIAcore® (BIAcore International AB, una empresa de GE Healthcare, Uppsala, Suecia y Piscataway, Nueva Jersey). Para más descripciones, véanse Jonsson et al. (1993, Ann. Biol. Clin. 51: 19-26), Jonsson et al. (1991 Biotechniques 11: 620-627), Johnsson et al. (1995, J. Mol. Recognit. 8: 125-131), y Johnson et al. (1991, Anal. Biochem. 198: 268-277).

Otra técnica de biosensores bien conocida para determinar las afinidades de las interacciones biomoleculares es la interferometría de biocapa (BLI) (véase, por ejemplo, Abdiche et al. 2008, Anal. Biochem. 377: 209-217). El término “interferometría de biocapa” o “BLI”, como se emplea en el presente documento, se refiere a una técnica óptica sin marcas que analiza el patrón de interferencia de la luz reflejada desde dos superficies: una capa de referencia interna (haz de referencia) y una capa de proteína inmovilizada en la punta del biosensor (haz de señal). Un cambio en la cantidad de moléculas unidas a la punta del biosensor provoca un cambio en el patrón de interferencia, referido como un cambio de longitud de onda (nm), cuya magnitud es una medida directa de la cantidad de moléculas unidas a la superficie de la punta del biosensor. Dado que las interacciones se pueden medir en tiempo real, se pueden determinar las tasas y afinidades de asociación y disociación.

Se puede realizar BLI, por ejemplo, utilizando los conocidos sistemas Octet® (ForteBio, una división de Pall Life Sciences, Menlo Park, EE. UU.).

Alternativamente, las afinidades se pueden medir en el Ensayo de Exclusión Cinética (KinExA) (véase, por ejemplo, Drake et al. 2004, Anal. Biochem., 328: 35-43), utilizando la plataforma KinExA® (Sapidyne Instruments Inc, Boise, EE. UU.). El término “KinExA”, como se emplea en el presente documento, se refiere a un método basado en solución para medir la afinidad de unión y la cinética de equilibrio verdadero de moléculas no modificadas. Se pasan soluciones equilibradas de un complejo anticuerpo/antígeno a través de una columna con cuentas prerrecubiertas con antígeno (o anticuerpo), permitiendo que el anticuerpo (o antígeno) libre se una a la molécula aplicada como recubrimiento. La detección del anticuerpo (o antígeno) así capturado se logra con una proteína marcada fluorescentemente que se une al anticuerpo (o antígeno).

El sistema de inmunoensayo GYROLAB® proporciona una plataforma para el bioanálisis automatizado y una rápida entrega de muestras (Fraley et al. 2013, Bioanalysis 5: 1765-74).

En algunas modalidades, un ISVD proporcionado en el presente documento tiene una constante de asociación (k_{on}) para la unión al PSMA humano seleccionada del grupo que consiste en al menos aproximadamente 10^3 $M^{-1}s^{-1}$, al menos aproximadamente 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ y al menos aproximadamente 10^5 $M^{-1}s^{-1}$, p. ej., medido por SPR, tal como se realiza en un aparato ProteOn XPR36, por ejemplo, a 25°.

En algunas modalidades, un ISVD proporcionado en el presente documento tiene una k_{on} para unirse a PSMA de primate no humano seleccionada del grupo que consiste en al menos aproximadamente 10^3 $M^{-1}s^{-1}$, al menos aproximadamente 10^4

$M^{-1}s^{-1}$ y al menos aproximadamente 10^5 $M^{-1}s^{-1}$, p. ej., medida por SPR, tal como se realiza en un aparato ProteOn XPR36, por ejemplo, a 25 °C.

En algunas modalidades, un ISVD proporcionado en el presente documento tiene una k_{off} para unirse a PSMA humano seleccionada del grupo que consiste en a lo sumo aproximadamente 10^{-2} s^{-1}, a lo sumo aproximadamente 10^{-3} s^{-1} y a lo sumo aproximadamente 10^{-4} s^{-1}, p. ej., medida por SPR, tal como se realiza en un aparato ProteOn XPR36, preferiblemente a 25 °C.

En algunas modalidades, un ISVD proporcionado en tiene una k_{off} para unirse a PSMA de primate no humano seleccionado del grupo que consiste en a lo sumo aproximadamente 10^{-1} s^{-1}, a lo sumo aproximadamente 10^{-2} s^{-1}, a lo sumo aproximadamente 10^{-3} s^{-1}, y a lo sumo aproximadamente 10^{-4} s^{-1}, p. ej., medida por SPR, tal como se realiza en un aparato ProteOn XPR36, p. ej., a 25 °C.

En algunas modalidades, un ISVD proporcionado en tiene una afinidad (K_D) para unirse a PSMA humano seleccionada del grupo que consiste en a lo sumo aproximadamente 10^{-6} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-7} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-8} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-8} M, y a lo sumo aproximadamente 10^{-9} M, p. ej., medida por SPR, tal como se realiza en un aparato ProteOn XPR36, p. ej., a 25 °C.

En algunas modalidades, un ISVD proporcionado en tiene una K_D para unirse a PSMA de primate no humano seleccionado del grupo que consiste en a lo sumo aproximadamente 10^{-6} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-7} M y a lo sumo aproximadamente 10^{-8} M, p. ej., medida por SPR, tal como se realiza en un aparato ProteOn XPR36, p. ej., a 25 °C.

En algunas modalidades, el ISVD de unión a PSMA de la presente tecnología se une a PSMA humano con la misma o menor constante de velocidad de disociación

(k_{off}) en comparación con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549). En algunas modalidades, el ISVD de la presente tecnología se une a PSMA de primates no humanos con k_{off} igual o inferior en comparación con un ISVD de QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGR TWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

En algunas modalidades, un paTCE comprende un dominio de unión que es un scFv y un dominio de unión que es un VHH. En algunas modalidades, el scFv comprende dominios VL y VH y se une de forma específica a un antígeno de célula efectora (tal como CD3), y el dominio VHH se une específicamente a un antígeno de célula cancerosa (tal como PSMA). En algunas modalidades, el scFv comprende seis CDR. En algunas modalidades, el scFv que comprende regiones VH y VL que comprenden secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 90 %, o 91 %, o 92 %, o 93 %, o 94 %, o 95 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 % idénticas a, o son idénticas a, secuencias de VL y VH emparejadas de un anticuerpo anti-CD3 identificado en la Tabla 6a. En algunas modalidades, el scFv comprende una región CDR-H1, una región CDR-H2, una región CDR-H3, una región CDR-L1, una región CDR-L2 y una región CDR-L3 de secuencias de VL y VH emparejadas de un anticuerpo anti-CD3 identificado en la Tabla 6a. En algunas modalidades, el VHH deriva de un anticuerpo anti-PSMA identificado como los anticuerpos establecidos en la Tabla 6f. En algunas modalidades, el VHH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90 %, o 91 %, o 92 %, o 93 %, o

94 %, o 95 %, o 96 %, o 97 % o 98 %, o 99 % idéntica a, o es idéntica a, una secuencia de VHH divulgada en la Tabla 6f. En algunas modalidades, el VHH comprende una región CDR-1, una región CDR-2 y una región CDR-3 de una secuencia de VHH en la Tabla 6f. En algunas modalidades, el scFv que comprende regiones VH y VL que comprenden secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 90 %, o 91 %, o 92 %, o 93 %, o 94 %, o 95 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 % idénticas a, o son idénticas a, secuencias de VL y VH emparejadas de un anticuerpo anti-PSMA identificado en la Tabla 6g.

En algunas modalidades, el scFv comprende una región CDR-H1, una región CDR-H2, una región CDR-H3, una región CDR-L1, una región CDR-L2 y una región CDR-L3 de secuencias de VL y VH emparejadas de un anticuerpo anti-PSMA identificado en la Tabla 6g. En algunas modalidades, un paTCE comprende un primer dominio de unión que es un scFv y un segundo dominio de unión que también es un scFv. En algunas modalidades, los scFv comprenden dominios VL y VH que derivan de anticuerpos monoclonales con especificidad de unión al marcador específico de tumor o un antígeno de una célula cancerosa y un antígeno de célula efectora, respectivamente. En algunas modalidades, el primer y segundo dominios de unión comprenden cada uno seis CDR derivadas de anticuerpos monoclonales con especificidad de unión a un marcador de células cancerosas, tal como un marcador específico de tumor y antígenos de células efectoras, respectivamente. En algunas modalidades, el primer y segundo dominios de unión de la primera parte de las composiciones en cuestión pueden tener 3, 4, 5 o 6 CDR dentro de cada dominio de unión. En algunas modalidades, un paTCE comprende un primer dominio de unión y un segundo dominio de unión en donde cada uno comprende una región CDR-H1, una región CDR-H2, una

región CDR-H3, una región CDR-L1, una región CDR-L2 y una región CDR-L3, en donde cada una de las regiones deriva de un anticuerpo monoclonal susceptible de unirse a un marcador específico de tumor o un antígeno de una célula cancerosa, y un antígeno de célula efectora, respectivamente.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión comprende regiones VH y VL derivadas de un anticuerpo monoclonal susceptible de unirse a CD3 humano. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión comprende un scFv que comprende regiones VH y VL en donde cada región VH y VL muestra al menos aproximadamente 90 %, o 91 %, o 92 %, o 93 %, o 94 % o 95 %. o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 % de identidad, o es idéntica, a las secuencias de VL y VH emparejadas de un anticuerpo anti-CD3 identificado en la Tabla 6a. En algunas modalidades, el segundo dominio comprende una región CDR-H1, una región CDR-H2, una región CDR-H3, una región CDR-L1, una región CDR-L2 y una región CDR-L3, en donde cada una de las regiones deriva de un anticuerpo monoclonal identificado en el presente documento como los anticuerpos mostrados en la Tabla 6a. En algunas modalidades, los dominios VH y/o VL pueden configurarse como scFv o dianticuerpos.

En algunas modalidades, un paTCE comprende un primer dominio de unión que es un dianticuerpo y un segundo dominio de unión que también es un dianticuerpo. En algunas modalidades, los dianticuerpos comprenden dominios VL y VH que derivan de anticuerpos monoclonales con especificidad de unión al marcador específico de tumor o un antígeno de una célula cancerosa y el antígeno de células efectoras, respectivamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona una composición de paTCE, en donde el segundo dominio de unión del dianticuerpo comprende

regiones VH y VL en donde cada una de las regiones VH y VL presenta al menos aproximadamente 90 %, o 91 %, o 92 % o 93 %. o 94 %, o 95 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 % de identidad, o es idéntica, a la secuencia de VL y VH del anticuerpo huUCHT1 de la Tabla 6a. En algunas modalidades, el segundo dominio del dianticuerpo de la composición deriva de un anticuerpo anti-CD3 descrito en el presente documento. En algunas modalidades, el dianticuerpo anti-CD3 está conectado a una secuencia de VHH de unión anti-PSMA divulgada en el presente documento.

Los métodos para medir la afinidad de unión y/u otra actividad biológica de un dominio de unión a antígeno pueden ser los divulgados en el presente documento o los métodos generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión de un par de unión (p. ej., anticuerpo y antígeno), denominada K_D, se puede determinar utilizando diversos ensayos adecuados que incluyen, pero sin limitarse a, ensayos de unión radiactivos, ensayos de unión no radiactivos tales como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia y resonancia de plasmones de superficie (SPR, Biacore), y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayo de exclusión cinética (KinExA®) o como se describe en los Ejemplos. Se puede determinar un aumento o disminución en la afinidad de unión, por ejemplo, el aumento de la afinidad de unión de un TCE que se ha escindido para eliminar un radical de enmascaramiento en comparación con el paTCE con el radical de enmascaramiento unido, midiendo la afinidad de unión del TCE a su compañero de unión diana con y sin el radical de enmascaramiento. La medición de la semivida de un conjunto quimérico en cuestión se puede realizar mediante diversos métodos adecuados. Por ejemplo, la semivida de una sustancia se puede determinar administrando la sustancia a un sujeto y tomando

periódicamente muestras de una muestra biológica (p. ej., fluido biológico tal como sangre o plasma o ascitis) para determinar la concentración y/o cantidad de esa sustancia en la muestra a lo largo del tiempo. La concentración de una sustancia en una muestra biológica se puede determinar utilizando varios métodos adecuados, incluidos ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunotransferencias y técnicas de cromatografía que incluyen cromatografía líquida de alta presión y cromatografía líquida rápida de proteínas. En algunos casos, la sustancia puede marcarse con una etiqueta detectable, tal como una etiqueta radiactiva o una etiqueta fluorescente, que se puede utilizar para determinar la concentración de la sustancia en la muestra (p. ej., una muestra de sangre o una muestra de plasma). A continuación, se determinan diversos parámetros farmacocinéticos a partir de los resultados, lo que se puede hacer utilizando paquetes de soporte lógico tales como el soporte lógico SoftMax Pro, o mediante cálculos manuales conocidos en la técnica.

Además, se pueden medir las propiedades fisicoquímicas de las composiciones de paTCE para determinar el grado de solubilidad, estructura y conservación de estabilidad. Se realizan ensayos de las composiciones en cuestión que permiten la determinación de las características de unión de los dominios de unión hacia un ligando, incluyendo afinidad y constantes de unión (K_D, k_{on} y k_{off}), la semivida de disociación del complejo ligando-receptor, así como la actividad del dominio de unión para inhibir la actividad biológica del ligando secuestrado en comparación con el ligando libre (valores de CI_{50}). El término “CE_{50}” se refiere a la concentración necesaria para lograr la mitad de la respuesta biológica máxima de la sustancia activa, y generalmente se determina mediante ELISA o ensayos basados en

células, incluidos los métodos de los Ejemplos descritos en el presente documento.

Dominios de unión anti-CD3

También se proporcionan anticuerpos anti-CD3, fragmentos de los mismos y proteínas de fusión que comprenden tales anticuerpos y/o fragmentos.

En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona composiciones de paTCE que comprenden un dominio de unión de una primera porción con afinidad de unión a células T. En algunas modalidades, el dominio de unión comprende VL y VH derivados de un anticuerpo monoclonal que se une a CD3. En algunas modalidades, el dominio de unión comprende VL y VH derivados de un anticuerpo monoclonal contra CD3 épsilon y/o CD3 delta. En algunas modalidades, el dominio de unión comprende VL y VH derivados de un anticuerpo monoclonal contra CD3 épsilon. En algunas modalidades, el dominio de unión comprende VL y VH derivados de un anticuerpo monoclonal contra CD3 delta. En la Tabla 6a se presentan ejemplos ilustrativos, no limitantes, de secuencias de VL y VH de anticuerpos monoclonales contra CD3. En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona un paTCE que comprende un dominio de unión con afinidad de unión a CD3 que comprende secuencias de VL y VH anti-CD3 expuestas en la Tabla 6a. En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona un paTCE que comprende un dominio de unión de la primera porción con afinidad de unión a CD3épsilon que comprende secuencias de VL y VH anti-CD3épsilon expuestas en la Tabla 6a. En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona una composición de paTCE, en donde un dominio de unión de la primera porción comprende un scFv que comprende regiones VH y VL en donde cada región VH y VL muestra al menos aproximadamente 90 %, o 91 %,

o 92 %, o 93 %, o 94 %, o 95 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 % de identidad o es idéntica a las secuencias de VL y VH emparejadas del anticuerpo anti-CD3 huUCHT1 de la Tabla 6a. En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona una composición de paTCE que comprende un dominio de unión con afinidad de unión a CD3 que comprende la región CDR-L1, la región CDR-L2, la región CDR-L3, la región CDR-H1, la región CDR-H2 y la región CDR-H3, en donde cada una de las cuales deriva de las respectivas secuencias de VL y VH anti-CD3 expuestas en la Tabla 6a. En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona una composición de paTCE que comprende un dominio de unión con afinidad de unión a CD3 que comprende una región CDR-L1 de RSSNGAVTSSNYAN (SEQ ID NO: 1), una región CDR-L2 de GTNKRAP (SEQ ID NO: 4), una región CDR-L3 de ALWYPNLWV (SEQ ID NO: 6), una región CDR-H1 de GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 12), una región CDR-H2 de RIRTKRNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 13), y una región CDR-H3 de HENFGNSYVSWFAH (SEQ ID NO: 10).

El complejo CD3 es un grupo de moléculas de la superficie celular que se asocia con el receptor de antígeno de células T (TCR) y funciona en la expresión del TCR en la superficie celular y en la cascada de transducción de señales que se origina cuando un ligando péptido:MHC se une al TCR. Sin vincularse a ninguna teoría científica, típicamente, cuando un antígeno se une al receptor de células T, el CD3 envía señales a través de la membrana celular al citoplasma dentro de la célula T. Esto provoca la activación de las células T que se dividen rápidamente para producir nuevas células T sensibilizadas para atacar al antígeno particular al que estuvo expuesto el TCR. El complejo CD3 está compuesto por la molécula CD3épsilon, junto con otros cuatro polipéptidos unidos a la membrana (CD3-gamma, -delta y/o -zeta). En seres humanos, CD3-épsilon está codificado por el gen CD3E en el Cromosoma

11. Los dominios intracelulares de cada una de las cadenas de CD3 contienen motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM) que sirven como punto de nucleación para la maquinaria de transducción de señales intracelulares tras el acoplamiento de receptores de células T.

Varias estrategias terapéuticas modulan la inmunidad de las células T dirigiéndose a la señalización de TCR, en particular los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD3 humano que se utilizan ampliamente clínicamente en regímenes inmunosupresores. El mAb de ratón específico para CD3 OKT3 fue el primer mAb autorizado para su uso en seres humanos (Sgro, C. Side-effects de a monoclonal anticuerpo, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. Toxicology 105:23-29, 1995) y se utiliza ampliamente clínicamente como agente inmunosupresor en trasplantes (Chatenoud, Clin. Transplant 7:422-430, (1993); Chatenoud, Nat. Rev. Immunol. 3:123-132 (2003); Kumar, Transplant. Proc. 30: 1351 -1352 (1998)), diabetes tipo 1 y psoriasis. Es importante destacar que los mAb anti-CD3 pueden inducir señalización parcial de células T y anergia clonal (Smith, JA, Nonmitogenic Anti-CD3 Monoclonal Antibodies Deliver a Partial T Cell Receptor Signal and Induce Clonal Anergy J. Exp. Med. 185:1413-1422 (1997)). OKT3 se ha descrito en la bibliografía como un mitógeno de células T, y también como un potente asesino de células T (Wong, JT. The mechanism de anti-CD3 monoclonal antibodies. Mediation de cytolysis by inter-T cell bridging. Transplantation 50:683-689 (1990)). En particular, los estudios de Wong demostraron que al unir las células T CD3 y las células diana, se podía lograr la destrucción de la diana y que ni la ADCC mediada por FcR ni la fijación del complemento eran necesarias para que el MAB anti-CD3 bivalente lisara las células diana.

OKT3 muestra actividad mitogénica y de destrucción de células T de forma dependiente del tiempo; después de la activación temprana de las células T que conduce a la liberación de citocinas, tras una administración adicional, OKT3 bloquea todas las funciones conocidas de las células T. Es debido a este bloqueo posterior de la función de las células T que OKT3 ha encontrado una aplicación tan amplia como inmunosupresor en regímenes terapéuticos para la reducción o incluso la abolición del rechazo de tejido de aloinjerto. Otros anticuerpos específicos para la molécula CD3 son divulgados por Tunnacliffe, en Int. Inmunol. 1 (1989), 546-50, los documento WO2005/118635 y WO2007/033230 describen anticuerpos monoclonales anti-CD3 épsilon humanos, la patente de Estados Unidos Núm. 5.821.337 describe las secuencias de VL y VH de Ab monoclonal anti-CD3 murino UCHT1 (muxCD3, Shalaby et al., J. Exp. Med. 175, 217-225 (1992) y una variante humanizada de este anticuerpo (hu UCHT1), y la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20120034228 divulga dominios de unión capaces de unirse a un epítopo de la cadena CD3 épsilon humana y de primate que no sea chimpancé.

En algunas modalidades, un dominio de anticuerpo anti-CD3 comprende una región VH que comprende la secuencia EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311), o las CDR de la misma, y una región VL que comprende la secuencia ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO: 361), o las CDR de la misma.

Tabla 6a: Anticuerpos monoclonales y secuencias anti-CD3

Nombre de Clon	**Nombre de Anticuerpo**	**Diana**	**Secuencia de VH**	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de VL**	**SEQ ID NO.**
huOKT3		CD3	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKAS**GYTFTRYTMH**WVRQAPGKGLEWIG**YINPSRGYTNYNQKVKD**RFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCAR**YYDDHYCLDY**WGQGTPVTVSS	**301**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSVSYMN**WYQQTPGKAPKRWIY**DTSKLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC**QQWSSNPFT**FGQGTKLQITR	**351**
huUCHT1		CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GYSFTGYTMN**WVRQAPGKGLEWVA**LINPYKGVST**YNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SGYYGDSDWYFDV**WGQGTLVTVSS	**302**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDIRNYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**YTSRLES**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC**QQGNTLPWT**FGQGTKVEIK	**352**
hu12F6		CD3	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKAS**GYTFTSYTMH**WVRQAPGKGLEWIG**YINPSSGYTKYNQKFKD**RFTISADKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCAR**WQDYDVYFDY**WGQGTPVTVSS	**303**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTC**RASSSVSYMH**WYQQTPGKAPKPWIY**ATSNLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYC**QQWSSNPPT**FGQGTKLQITR	**353**
mOKT3		CD3	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAS**GYTFTRYTMH**WVKQRPGQGLEWIG**YINPSRGYTNYNQKFKD**KATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**YYDDHYCLDY**WGQGTTLTVSS	**304**	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC**SASSSVSYMN**WYQQKSGTSPKRWIY**DTSKLAS**GVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYC**QQWSSNPFT**FGSGTKLEINR	**354**
MT103	blinatumomab	CD3	DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTS**GYTFTRYTMH**WVKQRPGQGLEWIG**YINPSRGYTNYNQKFKD**KATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**YYDDHYCLDY**WGQGTTLTVSS	**305**	DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTC**RASSSVSYMN**WYQQKSGTSPKRWIY**DTSKVAS**GVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC**QQWSSNPLT**FGAGTKLELK	**355**
MT110	solitomab	CD3	DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTRYTMH**WVRQAPGQGLEWIG**YINPSRGYTNYADSVKG**RFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATY	**306**	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSYMN**WYQQKPGKAPKRWIY**DTSKVAS**GVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATY	**356**

Nombre de Clon	Nombre de Anticuerpo	Diana	Secuencia de VH	SEQ ID NO.	Secuencia de VL	SEQ ID NO.
			YCAR**YYDDHYCLDY**WGQGTTVTVSS		YC**QQWSSNPLT**FGGGTKVEIK	
CD3.7		CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS	**307**	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGYYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**ALWYSNRWV**FGGGTKLTVL	**357**
CD3.8		CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFNTYAMN**WVRQAPGKGLEWVG**RIRSKYNNYATYYADSVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR**HGNFGNSYVSWFAY**WGQGTLVTVSS	**308**	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSNYA**NWVQQKPGQAPRGLIG**GTNKRAP**GVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYC**ALWYSNLWV**FGGGTKLTVL	**358**
CD3.9		CD3	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNTYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYVSWFAY**WGQGTLVTVSS	**309**	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**RSSTGAVTTSNYAN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTNKRAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**ALWYSNLWV**FGGGTKLTVL	**359**
CD3.10		CD3	EVKLLESGGGLVQPKGSLKLSCAAS**GFTFNTYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADSVKD**RFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVR**HGNFGNSYVSWFAY**WGQGTLVTVSS	**310**	QAVVTQESALTTSPGETVTLTC**RSSTGAVTTSNYAN**WVQEKPDHLFTGLIG**GTNKRAP**GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC**ALWYSNLWV**FGGGTKLTVL	**360**
CD3.228		CD3	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSTYAMN**WVRQAPGKGLEWVG**RIRTKRNNYATYYADSVKG**RFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR**HENFGNSYVSWFAH**WGQGTLVTVSS	**311**	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**RSSNGAVTSSNYAN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTNKRAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC**ALWYPNLWV**FGGGTKLTVL	**361**
CD3.23		CD3	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNTYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADSVKD**	**102**	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**RSSNGAVTSSNYAN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTNKRAP**GTPARFSGSLL	**101**

Nombre de Clon	Nombre de Anticuerpo	Diana	Secuencia de VH	SEQ ID NO.	Secuencia de VL	SEQ ID NO.
			RFTISRDDSKNTVY LQMNNLKTEDTAVY YCVR**HENFGNSYV SWFAH**WGQGTLVT VSS		GGKAALTLSGVQPE DEAVYYC**ALWYPNL WV**FGGGTKLTVL	
CD3.24		CD3	EVQLLESGGGIVQP GGSLKLSCAAS**GFT FNTYAMN**WVRQAP GKGLEWVA**RIRSKY NNYATYYADSVKD** RFTISRDDSKNTVY LQMNNLKTEDTAVY YCVR**HENFGNSYV SWFAH**WGQGTLVT VSS	**102**	ELVVTQEPSLTVSP GGTVTLTC**RSSNGE VTTSNYAN**WVQQK PGQAPRGLIG**GTIKR AP**GTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPED EAVYYC**ALWYPNL WV**FGGGTKLTVL	**103**
CD3.30		CD3	EVQLQESGGGIVQP GGSLKLSCAAS**GFT FNTYAMN**WVRQAP GKGLEWVA**RIRSKY NNYATYYADSVKD** RFTISRDDSKNTVY LQMNNLKTEDTAVY YCVR**HENFGNSYV SWFAH**WGQGTLVT VSS	**105**	ELVVTQEPSLTVSP GGTVTLTC**RSSNGA VTSSNYAN**WVQQK PGQAPRGLIG**GTNK RAP**GTPARFSGSSL GGKAALTLSGVQPE DEAVYYC**ALWYPNL WV**FGGGTKLTVL	**104**
CD3.31		CD3	EVQLQESGGGIVQP GGSLKLSCAAS**GFT FNTYAMN**WVRQAP GKGLEWVA**RIRSKY NNYATYYADSVKD** RFTISRDDSKNTVY LQMNNLKTEDTAVY YCVR**HENFGNSYV SWFAH**WGQGTLVT VSS	**105**	ELVVTQEPSLTVSP GGTVTLTC**RSSNGA VTSSNYAN**WVQQK PGQAPRGLIG**GTNK RAP**GTPARFSGSLL GGSAALTLSGVQPE DEAVYYC**ALWYPNL WV**FGGGTKLTVL	**106**
CD3.32		CD3	EVQLQESGGGIVQP GGSLKLSCAAS**GFT FNTYAMN**WVRQAP GKGLEWVA**RIRSKY NNYATYYADSVKD** RFTISRDDSKNTVY LQMNNLKTEDTAVY YCVR**HENFGNSYV SWFAH**WGQGTLVT VSS	**105**	ELVVTQEPSLTVSP GGTVTLTC**RSSNGA VTSSNYAN**WVQQK PGQAPRGLIG**GTNK RAP**GTPARFSGSSL GGSAALTLSGVQPE DEAVYYC**ALWYPNL WV**FGGGTKLTVL	**107**
CD3.33		CD3	EVQLQESGGGLVQ PGGSLKLSCAAS**GF TFNTYAMN**WVRQA PGKGLEWVA**RIRSK YNNYATYYADSVK D**RFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAV YYCVR**HGNFGNSY VSWFAY**WGQGTLV TVSS	**111**	ELVVTQEPSLTVSP GGTVTLTC**RSSTGA VTTSNYAN**WVQQK PGQAPRGLIG**GTNK RAP**GTPARFSGSSL GGSAALTLSGVQPE DEAEYYC**ALWYSNL WV**FGGGTKLTVL	**110**

* las secuencias subrayadas, si están presentes, son CDR dentro de VL y VH

En algunas modalidades, la divulgación se refiere a fragmentos de unión a antígeno (AF) que tienen afinidad de unión específica por un antígeno de célula efectora.

Diversos AF que se unen a antígenos de células efectoras, particularmente CD3 en células T, tienen una utilidad particular para emparejarse con un fragmento de unión a antígeno con afinidad de unión a antígenos de PSMA asociados con una célula o tejido enfermo en formatos de composición para reclutar y llevar a cabo la destrucción celular mediada por células efectoras de la célula o tejido enfermo.

La especificidad de unión al antígeno de interés puede determinarse mediante regiones determinantes de complementariedad, o CDR, tales como CDR de cadena ligera o CDR de cadena pesada. En muchos casos, la especificidad de unión está determinada por las CDR de cadena ligera y las CDR de cadena pesada. Una combinación determinada de CDR de cadena pesada y CDR de cadena ligera proporciona un bolsillo de unión determinado que confiere mayor afinidad y/o especificidad hacia un antígeno de célula efectora en comparación con otros antígenos de referencia. Las composiciones biespecíficas resultantes que, por un lado, se unen a un antígeno de célula efectora y, por otro lado, se unen a un antígeno en la célula o tejido enfermo, que tienen un primer fragmento de unión a antígeno para PSMA conectado mediante un conector peptídico corto y flexible a un segundo fragmento de unión a antígeno con especificidad de unión a un antígeno de célula efectora son biespecíficas, teniendo cada fragmento de unión a antígeno una afinidad de unión específica a sus respectivos ligandos.

Se entenderá que, en tales composiciones, un AF dirigido contra PSMA de un tejido enfermo se utiliza combinado con un AF dirigido hacia un marcador de células efectoras para acercar una célula efectora a la célula de un tejido enfermo con el fin de efectuar la citólisis de la célula del tejido enfermo. Adicionalmente, el primer

fragmento de antígeno (AF1) y el segundo fragmento de antígeno (AF2) se incorporan a los polipéptidos diseñados específicamente que comprenden segmentos de liberación escindibles y segmentos ELNN para conferir características inactivas a las composiciones que se activan mediante la liberación de AF1 y AF2 fusionados tras la escisión de los segmentos de liberación cuando está cerca del tejido enfermo que tiene proteasas capaces de escindir los segmentos de liberación en una o más ubicaciones en la secuencia del segmento de liberación.

En algunas modalidades, el AF2 de las composiciones en cuestión tiene afinidad de unión por un antígeno de célula efectora expresado en la superficie de una célula T. En algunas modalidades, el AF2 de las composiciones en cuestión tiene afinidad de unión por CD3. En algunas modalidades, el AF2 de las composiciones en cuestión tiene afinidad de unión por un miembro del complejo CD3, que incluye en forma individual o en forma combinada independientemente todas las subunidades CD3 conocidas del complejo CD3; por ejemplo, CD3 épsilon, CD3 delta, CD3 gamma y CD3 zeta. En algunas modalidades, el AF2 tiene afinidad de unión por CD3 épsilon, CD3 delta, CD3 gamma o CD3 zeta.

En algunas modalidades, la divulgación proporciona un dominio de unión a antígeno (p. ej., anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que se une al receptor de células T del cúmulo de diferenciación 3 (CD3), que comprende las siguientes CDR: una CDR1 de la región VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con $RSSX_1GAVTX_2SNYAN$, en donde X_1 corresponde a T o N, y X_2 corresponde a T o S; una CDR2 de la región VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al

menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % identidad, con GTNKRAP; una CDR3 de la región VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ALWYX$_4$NLWV, en donde X$_4$ corresponde a S o P; una CDR1 de la región VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GFTFX$_8$TYAMN, en donde X$_8$ corresponde a S o N; una CDR2 de la región VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RIRX$_{10}$KX$_{11}$NNYATYYADSVKX$_{12}$, en donde X$_{10}$ corresponde a T o S, X$_{11}$ corresponde a R o Y, y X$_{12}$ corresponde a G o D; y una CDR3 de la región VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con HX$_{15}$NFGNSYVSWFAX$_{16}$, en donde X$_{15}$ corresponde a E o G, y X$_{16}$ corresponde a H o Y.

En algunas modalidades, la divulgación proporciona un dominio de unión a antígeno (p. ej., anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que se une al receptor de células T del cúmulo de diferenciación 3 (CD3), que comprende las siguientes CDR: una CDR1 de la región VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RSSNGAVTSSNYAN; una CDR2 de la región VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % identidad, con GTNKRAP; una

CDR3 de la región VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ALWYPNLWV; una CDR1 de la región VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GFTFSTYAMN; una CDR2 de la región VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RIRTKRNNYATYYADSVKG; y una CDR3 de la región VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con HENFGNSYVSWFAH.

En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende las siguientes FR: una FR1 de la región VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC; una FR2 de la región VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVQQKPGQAPRGLIG; una FR3 de la región VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC; una FR4 de la región VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con FGGGTKLTVL; una FR1 de la región VH con una secuencia de

aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS; una FR2 de la región VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVRQAPGKGLEWVG; una FR3 de la región VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR; y una FR4 de la región VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTLVTVSS.

En algunas modalidades, la divulgación proporciona un dominio de unión a antígeno (p. ej., anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que se une a CD3, que comprende: una región VL que comprende las tres CDR de VL, en donde las tres CDR de VL comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de una región VL que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSX$_1$GAVTX$_2$SNYANWVQQKPGQAPRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAX$_3$YYCALWYX$_4$NLWVFGGG TKLTVL, en donde X$_1$ corresponde a T o N, X$_2$ corresponde a T o S, X$_3$ corresponde a E o V, y X$_4$ corresponde a S o P; y una región VH que comprende tres CDR de VH, en donde las tres CDR de VH comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de una región VH que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: EVQLX$_5$ESGGGX$_6$VQPGGSLX$_7$LSCAASGFTFX$_8$TYAMNWVRQAPGKGLEWVX$_9$ RIRX$_{10}$KX$_{11}$NNYATYYADSVKX$_{12}$RFTISRDDSKNTX$_{13}$YLQMNX$_{14}$LKTEDTAVYYC

VRHX$_{15}$NFGNSYVSWFAX$_{16}$WGQGTLVTVSS, en donde X$_5$ corresponde a V o L, X$_6$ corresponde a I o L, X$_7$ corresponde a R o K, X$_8$ corresponde a S o N, X$_9$ corresponde a G o A, X$_{10}$ corresponde a T o S, X$_{11}$ corresponde a R o Y, X$_{12}$ corresponde a G o D, X$_{13}$ corresponde a V o A, X$_{14}$ corresponde a S o N, X$_{15}$ corresponde a E o G, y X$_{16}$ corresponde a H o Y.

En algunas modalidades, la divulgación proporciona un dominio de unión a antígeno (p. ej., anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que se une a CD3, que comprende: una región VL que comprende tres CDR de VL, en donde las tres CDR de VL comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de una región VL que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL (SEQ ID NO: 361); y una región VH que comprende tres CDR de VH, en donde las tres CDR de VH comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de una región VH que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS YVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311).

En algunas modalidades, la divulgación proporciona un dominio de unión a antígeno (p. ej., anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que se une a CD3, que comprende un par de secuencia de aminoácidos de la región VL de SEQ ID NO/secuencia de aminoácidos de la región VH de SEQ ID NO seleccionado del grupo que consiste en: 896/897; 902/903; 700/701; 702/703; 716/717; 718/719; 728/729; 736/737; 738/739; 740/741; 742/743; 744/745; 746/747; 748/749; 750/751; 752/753; 754/755; 756/757; 758/759; 760/761; 762/763; 764/765; 766/767; 774/775; 776/777;

790/791; 792/793; 798/799; 800/801; 806/807; 808/809; 814/815; 816/817; 822/823; 824/825; o 826/867.

En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona un fragmento de unión a antígeno (p. ej., AF1 o AF2) que se une al complejo de proteína CD3 que tiene una estabilidad mejorada en comparación con los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen a CD3 conocidos en la técnica. En algunas modalidades, un fragmento de unión al antígeno CD3 de la divulgación está diseñado para conferir un mayor grado de estabilidad a las composiciones de fragmentos de unión a antígeno biespecíficas quiméricas en las que están integrados, lo que conduce a una mayor expresión y recuperación de la proteína de fusión, una mayor vida útil y mayor estabilidad cuando se administra a un sujeto. En algunas modalidades, un AF anti-CD3 de la presente divulgación tiene un mayor grado de estabilidad térmica en comparación con ciertos anticuerpos de unión a CD3 y fragmentos de unión a antígeno conocidos en la técnica. En algunas modalidades, un AF anti-CD3 de la presente divulgación tiene un mayor grado de estabilidad térmica en comparación con SP34 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas modalidades, un AF anti-CD3 de la presente divulgación tiene un mayor grado de estabilidad térmica en comparación con CD3.9 y/o CD3.23 como se divulga en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT Núm. WO2021263058, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia. En algunas modalidades, el AF anti-CD3 de la presente divulgación es menos inmunogénico en un ser humano en comparación con ciertos anticuerpos de unión a CD3 y fragmentos de unión a antígeno conocidos en la técnica. En algunas modalidades, un AF anti-CD3 de la presente divulgación es menos inmunogénico que SP34 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas modalidades, un AF anti-CD3 de la presente divulgación es

menos inmunogénico que CD3.9 y/o CD3.23 como se divulga en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT Núm. WO2021263058, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia. En algunas modalidades, el grado en el que un AF es inmunogénico se determina mediante un método de predicción de inmunogenicidad tal como TEPITOPEpan (descrito por Zhang et al. en PLoS One. 2012;7(2):e30483. doi: 10.1371/journal.pone.0030483, PMID: 22383964, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia) o NetMHCpan-4.1 y NetMHCIIpan-4.0 (cada uno descrito por Reynisson et al., en Nucleic Acids Res 2020;48(W1):W449-W454. doi: 10.1093 /nar/gkaa379., PMID: 32406916, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia). En algunas modalidades, el AF anti-CD3 utilizado como componentes de las composiciones de fragmentos de unión a antígeno biespecíficas quiméricas en las que están integrados muestra propiedades farmacéuticas favorables, que incluyen alta termoestabilidad y baja propensión a la agregación, lo que da como resultado una expresión y recuperación mejoradas durante la elaboración y almacenamiento, además de promover una semivida sérica prolongada. Las propiedades biofísicas, tales como la termoestabilidad, a menudo están limitadas por los dominios variables de los anticuerpos, que difieren mucho en sus propiedades intrínsecas. La alta estabilidad térmica a menudo se asocia con altos niveles de expresión y otras propiedades deseadas, incluida la de ser menos susceptible a la agregación (Buchanan A, et al. Engineering a therapeutic IgG molecule to address cysteinilation, aggregation and enhance thermal stability and expression. MAbs 2013; 5: 255). En algunas modalidades, la estabilidad térmica se determina midiendo la “temperatura de fusión” (T_m), que se define como la temperatura a la que se desnaturalizan la mitad de las moléculas. La temperatura de fusión de cada

heterodímero es indicativa de su estabilidad térmica. Los ensayos in vitro para determinar la T_m son conocidos en la técnica, incluidos los métodos descritos en los Ejemplos a continuación. El punto de fusión del heterodímero se puede medir utilizando técnicas tales como calorimetría diferencial de barrido (Chen et al (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) Immunol Lett 68:47-52). Alternativamente, la estabilidad térmica del heterodímero se puede medir utilizando dicroísmo circular (Murray et al. (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9), o como se describe en los Ejemplos, a continuación.

En algunas modalidades de los polipéptidos de esta divulgación, el fragmento de unión al antígeno (p. ej., AF1 o AF2) puede exhibir una mayor estabilidad térmica que un fragmento de unión anti-CD3 que consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 206 (véase la Tabla 6e), como se evidencia en un ensayo *in vitro* por una temperatura de fusión (T_m) más alta del primer fragmento de unión al antígeno con respecto a la del fragmento de unión anti-CD3; o tras incorporar el primer fragmento de unión a antígeno a un dominio de unión a antígeno biespecífico de prueba, una T_m mayor del dominio de unión a antígeno biespecífico de prueba con respecto a la de un dominio de unión a antígeno biespecífico de control, en donde el dominio de unión a antígeno biespecífico de prueba comprende el primer fragmento de unión a antígeno y un fragmento de unión a antígeno de referencia que se une a un antígeno distinto de CD3; y en donde el dominio de unión al antígeno biespecífico de control consiste en el fragmento de unión anti-CD3 que consiste en la secuencia de SEQ ID NO:206 (véase la Tabla 6e) y el fragmento de unión al antígeno de referencia. En algunas modalidades, la temperatura de fusión (T_m) del primer fragmento de unión a antígeno puede ser al menos 2 °C mayor, o al menos 3 °C mayor, o al menos 4 °C mayor, o al menos 5 °C mayor

que la T_m del fragmento de unión anti-CD3 que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 206 (véase la Tabla 6e).

En algunas modalidades, los polipéptidos de cualquiera de las modalidades de la composición en cuestión descritas en el presente documento comprenden un fragmento de unión a antígeno (AF) que se une específicamente a CD3 humano. El fragmento de unión a antígeno (AF) puede unirse específicamente a CD3 humano. En algunas modalidades, el fragmento de unión a antígeno (AF) puede unirse a una subunidad del complejo CD3 identificada en el presente documento como unidad CD3 épsilon, CD3 delta, CD3 gamma o CD3 zeta de CD3. El fragmento de unión a antígeno (AF) puede unirse a un fragmento CD3 épsilon de CD3. En algunas modalidades, el fragmento de unión a antígeno (AF) puede unirse específicamente a CD3 humano con una constante de afinidad de unión (K_D) entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 400 nM, o entre aproximadamente 50 nM y aproximadamente 350 nM, o entre aproximadamente 100 nM y 300 nM, según se determina en un ensayo de unión a antígeno in vitro que comprende un antígeno CD3 humano. En algunas modalidades, los polipéptidos de cualquiera de las modalidades de la composición en cuestión descritas en el presente documento comprenden un fragmento de unión a antígeno (AF) que se une específicamente a CD3 humano con una afinidad de unión (K_D) más débil que aproximadamente 10 nM, o aproximadamente 50 nM, o aproximadamente 100 nM, o aproximadamente 150 nM, o aproximadamente 200 nM, o aproximadamente 250 nM, o aproximadamente 300 nM, o aproximadamente 350 nM, o más débil que aproximadamente 400 nM como se determina en un ensayo de unión a antígeno in vitro. Para mayor claridad, un fragmento de unión a antígeno (AF) con una K_D de 400 se une a su ligando más

débilmente que uno con una K_D de 10 nM. En algunas modalidades, los polipéptidos de cualquiera de las modalidades de la composición en cuestión descritas en el presente documento comprenden un fragmento de unión a antígeno (AF) que se une específicamente a CD3 humano con una afinidad de unión al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o al menos 10 veces más débil que la de un fragmento de unión a antígeno que consiste en una secuencia de aminoácidos de la Tabla 6f-h, según se determina por las respectivas afinidades de unión (K_D) en un ensayo de unión a antígeno in vitro.

En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona polipéptidos biespecíficos que comprenden un fragmento de unión a antígeno (AF) que muestra una afinidad de unión a CD3 (AF anti-CD3) que es al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o al menos 1000 veces más débil con respecto a la de un AF anti-PSMA de modalidades descritas en el presente documento que se incorporan a los polipéptidos en cuestión, según se determina por las respectivas afinidades de unión (K_D) en un ensayo de unión a antígeno in vitro.

La afinidad de unión de las composiciones en cuestión por los ligandos diana se puede analizar, por ejemplo, utilizando ensayos de unión o de unión competitiva, tales como ensayos Biacore con receptores unidos a chips o proteínas de unión o ensayos ELISA, como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.534.617, ensayos descritos en los ejemplos del presente documento, ensayos de radiorreceptores, u otros ensayos conocidos en la técnica. La constante de afinidad de unión puede determinarse a continuación, utilizando métodos convencionales,

tales como el análisis de Scatchard, como describen van Zoelen, et al., en Trends Pharmacol Sciences (1998) 19)12):487, u otros métodos conocidos en la técnica.

En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona un fragmento de unión a antígeno (AF) que se une a CD3 (AF anti-CD3) y se incorpora a una composición polipeptídica quimérica biespecífica que está diseñada para tener un punto isoeléctrico (pI) que confiere mayor estabilidad mejorada a la composición en comparación con las composiciones correspondientes que comprenden anticuerpos de unión a CD3 o fragmentos de unión a antígeno conocidos en la técnica. En algunas modalidades, los polipéptidos de cualquiera de las modalidades de la composición en cuestión descritas en el presente documento comprenden AF que se une a CD3 (AF anti-CD3) en donde el AF anti-CD3 muestra un pI que está entre 6,0 y 6,6, inclusive. En algunas modalidades, los polipéptidos de cualquiera de las modalidades de la composición en cuestión descritas en el presente documento comprenden AF que se une a CD3 (AF anti-CD3) en donde el AF anti-CD3 muestra un pI que es al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5. 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 unidades de pH inferiores al pI de un fragmento de unión a antígeno de referencia (*p. ej*., que consiste en una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 206 (véase la Tabla 6e)). En algunas modalidades, los polipéptidos de cualquiera de las modalidades de la composición en cuestión descritas en el presente documento comprenden un AF que se une a CD3 (AF anti-CD3) fusionado a otro AF que se une a un antígeno PSMA (AF anti-PSMA) en donde el AF anti-CD3 muestra un pI que está dentro de al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 o 1,5 unidades de pH del pI del AF que se une al antígeno PSMA o un epítopo del mismo. En algunas modalidades, los polipéptidos de cualquiera de las modalidades de la composición en cuestión descritas en el presente documento comprenden un AF que se une a CD3 (AF anti-CD3) fusionado a un AF que se une a un antígeno PSMA (AF

anti-PSMA) en donde el AF muestra un pI que está dentro de al menos aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,5, o al menos aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,2, o al menos aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0, o al menos aproximadamente 0,7 a aproximadamente 0,9 unidades de pH del pI del AF anti-CD3. Se pretende específicamente que mediante tal diseño, en donde el pI de los dos fragmentos de unión a antígeno está dentro de dichos intervalos, los fragmentos de unión a antígeno fusionados resultantes confieran un mayor grado de estabilidad a las composiciones de fragmentos de unión a antígeno biespecíficas quiméricas en las que están integrados, lo que lleva a una mejora de la expresión y un aumento de recuperación de la proteína de fusión en forma soluble, no agregada, una mayor vida útil de las composiciones de polipéptidos biespecíficas quiméricas formuladas y una mayor estabilidad cuando la composición se administra a un sujeto. En algunas modalidades, tener los dos AF (el AF anti-CD3 y el AF anti-PSMA) dentro de un rango de pI relativamente estrecho puede permitir la selección de un tampón u otra solución en la que ambos AF (AF anti-CD3 y AF anti-PSMA) son estables, promoviendo así la estabilidad general de la composición. En algunas modalidades, el fragmento de unión al antígeno (AF) puede exhibir un punto isoeléctrico (pI) que es menor o igual a 6,6. En algunas modalidades, el fragmento de unión a antígeno (AF) puede exhibir un punto isoeléctrico (pI) que está entre 6,0 y 6,6, inclusive. En algunas modalidades, el fragmento de unión a antígeno (AF) puede exhibir un punto isoeléctrico (pI) que es al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 unidades de pH inferior que el pI de un fragmento de unión a antígeno de referencia que consiste en una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 206 (véase la Tabla 6e). En algunas modalidades, el fragmento de unión a antígeno (AF) puede unirse específicamente a CD3 humano con una constante de afinidad de unión (K_D) entre aproximadamente 10 nM y

aproximadamente 400 nM (tal como se determina en un ensayo de unión a antígeno *in vitro* que comprende un antígeno CD3 humano). En algunas modalidades, el fragmento de unión a antígeno (AF) puede unirse específicamente a CD3 humano con una afinidad de unión (K_D) de menos de aproximadamente 10 nM, o menos de aproximadamente 50 nM, o menos de aproximadamente 100 nM, o menos de aproximadamente 150 nM, o menos de aproximadamente 200 nM, o menos de aproximadamente 250 nM, o menos de aproximadamente 300 nM, o menos de aproximadamente 350 nM, o menos de aproximadamente 400 nM (tal como se determina en un ensayo de unión a antígeno *in vitro*). En algunas modalidades, el fragmento de unión al antígeno (AF) puede exhibir una afinidad de unión a CD3 que es al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, o al menos 10 veces más débil con respecto a la de un fragmento de unión a antígeno que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206 (véase la Tabla 6e) (tal como se determina mediante las respectivas afinidades de unión (K_D) en un ensayo de unión a antígeno *in vitro*).

En algunas modalidades, el VL y VH de los fragmentos de unión al antígeno están fusionados mediante conectores relativamente largos, que consisten en 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 aminoácidos hidrófilos que, cuando se unen entre sí, tienen una característica flexible. En algunas modalidades, el VL y VH de cualquiera de las modalidades de scFv descritas en el presente documento están conectados mediante un conector relativamente largo que tiene la secuencia SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, el VL y VH de cualquiera de las modalidades de scFv descritas en el presente documento están conectados mediante conectores relativamente largos de aminoácidos hidrófilos que tienen las secuencias

GSGEGSEGEGGGEGSEGEGSGEGGEGEGSG (SEQ ID NO: 82), TGSGEGSEGEGGGEGSEGEGSGEGGEGEGSGT (SEQ ID NO: 83), GATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEG (SEQ ID NO: 84), o GSAAPTAGTTPSASPAPPTGGSSAAGSPST (SEQ ID NO: 85). En algunas modalidades, AF1 y AF2 están conectados entre sí mediante un conector corto de aminoácidos hidrófilos que tiene 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos. En algunas modalidades, las secuencias conectoras cortas se identifican en el presente documento como las secuencias SGGGGS (SEQ ID NO: 86), GGGGS (SEQ ID NO: 87), GGSGGS (SEQ ID NO: 88), GGS o GSP. En algunas modalidades, la divulgación proporciona composiciones que comprenden un dianticuerpo de cadena sencilla en el que después del plegamiento, el primer dominio (VL o VH) se empareja con el último dominio (VH o VL) para formar un scFv y los dos dominios del centro están emparejados para formar el otro scFv en el que el primer y segundo dominio, así como el tercer y último dominios, están fusionados entre sí mediante uno de los conectores cortos anteriores y el segundo y tercer dominios variables están fusionados mediante uno de los conectores relativamente largos anteriores. En algunas modalidades, la selección del conector corto y del conector relativamente largo es para evitar el emparejamiento incorrecto de dominios variables adyacentes, facilitando así la formación de una configuración de cadena sencilla que comprende el VL y VH del primer fragmento de unión a antígeno y el segundo fragmento de unión a antígeno.

Tabla 6b. Secuencias de CDR contra CD3 ilustrativas

Dominio de Anticuerpo	REGIÓN CDR	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
3.23, 3.30, 3.31, 3.32, 3.228	CDR-L1	RSSNGAVTSSNYAN	1
3.24	CDR-L1	RSSNGEVTTSNYAN	2
3.33, 3.9	CDR-L1	RSSTGAVTTSNYAN	3
3.23, 3.30, 3.31, 3.32, 3.9, 3.33, 3.228	CDR-L2	GTNKRAP	4
3.24	CDR-L2	GTIKRAP	5
3.23, 3.24, 3.30, 3.31, 3.32, 3.228	CDR-L3	ALWYPNLWV	6
3.33, 3.9	CDR-L3	ALWYSNLWV	7
3.23, 3.24, 3.30, 3.31, 3.32, 3.9, 3.33	CDR-H1	GFTFNTYAMN	8
3.228	CDR-H1	GFTFSTYAMN	12
3.23, 3.24, 3.30, 3.31, 3.32, 3.9, 3.33	CDR-H2	RIRSKYNNYATYYADSVKD	9
3.228	CDR-H2	RIRTKRNNYATYYADSVKG	13
3.23. 3.24, 3.30, 3.31, 3.32, 3.228	CDR-H3	HENFGNSYVSWFAH	10
3.9, 3.33	CDR-H3	HGNFGNSYVSWFAY	11

Tabla 6c. Secuencias de FR contra CD3 ilustrativas

Dominio de Anticuerpo	REGIÓN FR	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
3.23, 3.24, 3.30, 3.31, 3.32, 3.9, 3.33, 3.228	FR-L1	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC	51
3.23, 3.24, 3.30, 3.31, 3.32, 3.9, 3.33, 3.228	FR-L2	WVQQKPGQAPRGLIG	52
3.23, 3.24, 3.228	FR-L3	GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC	53
3.30	FR-L3	GTPARFSGSSLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC	54
3.31	FR-L3	GTPARFSGSLLGGSAALTLSGVQPEDEAVYYC	55
3.32	FR-L3	GTPARFSGSSLGGSAALTLSGVQPEDEAVYYC	56
3.9	FR-L3	GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC	57

Dominio de Anticuerpo	REGIÓN FR	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
3.33	FR-L3	GTPARFSGSSLGGSAALTLSGVQPEDEAEYYC	58
3.23, 3.24, 3.30, 3.31, 3.32, 3.9, 3.33, 3.228	FR-L4	FGGGTKLTVL	59
3.228	FR-H1	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS	400
3.23, 3.24	FR-H1	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAAS	60
3.30, 3.31, 3.32	FR-H1	EVQLQESGGGIVQPGGSLKLSCAAS	61
3.33	FR-H1	EVQLQESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	62
3.9	FR-H1	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	63
3.23, 3.24, 3.30, 3.31, 3.32, 3.9, 3.33	FR-H2	WVRQAPGKGLEWVA	64
3.228	FR-H2	WVRQAPGKGLEWVG	401
3.23, 3.24, 3.30, 3.31, 3.32	FR-H3	RFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVR	65
3.9, 3.33	FR-H3	RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR	66
3.228	FR-H3	RFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR	402
3.23, 3.24, 3.30, 3.31, 3.32, 3.9, 3.33, 3.228	FR-H4	WGQGTLVTVSS	67

Tabla 6d: Secuencias de VL Y VH contra CD3 ilustrativas

Dominio de Anticuerpo	REGION	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
3.23	VL	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	101
3.23, 3.24	VH	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	102
3.24	VL	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGEVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTIKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	103
3.30	VL	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSSLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	104
3.30, 3.31, 3.32	VH	EVQLQESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	105
3.31	VL	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGSAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	106

Dominio de Anticuerpo	REGION	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
3.32	VL	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSSLGGSAA LTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	107
3.9	VL	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	108
3.9	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS	109
3.33	VL	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSSLGGSAA LTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	110
3.33	VH	EVQLQESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS	111
3.228	VL	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	361
3.228	VH	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWV RQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISR DDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVS WFAHWGQGTLVTVSS	311

Tabla 6e: Secuencias de ScFv contra CD3 ilustrativas

Dominio de Anticuerpo	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
3.23	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYP NLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQ LLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	201
3.24	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGEVTTSNYANWVQQKPGQAPR GLIGGTIKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPN LWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLL ESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	202
3.30	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSSLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYP NLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQ LQESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	203

Dominio de Anticuerpo	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
3.31	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGSAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYP NLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQ LQESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	204
3.32	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSSLGGSAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYP NLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQ LQESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	205
3.9	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYS NLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQ LLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	206
3.33	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSSLGGSAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYS NLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQ LQESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	207
4.11	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLI YRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSL SGLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGQV QLQQWGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV SRINSDGSSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RELRWGNWGQGTLVTVSS	208
4.12	QAGLTQPPSASGTPGQRVTLSCSGSYSNIGTYYVYWYQQLPGTAPKLL IYSNDQRLSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAAYYCAAWDDSL NGWAFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGQVQ LQQWGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS RINSDGSSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ELRWGNWGQGTLVTVSS	209
4.13	QPGLTQPPSASGTPGQRVTLSCSGRSSNIGSYYVYWYQHLPGMAPKL LIYRNSRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDDS LKSWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGQV QLQQWGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV SRINSDGSSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RELRWGNWGQGTLVTVSS	210
4.14	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGTNYVYWYQQFPGTAPKLLI YSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSGSLAISGLQSEDEADYSCAAWDDSL NGWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGQVQ LVQWGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS RINSDGSSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ELRWGNWGQGTLVTVSS	211
4.15	QPGLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLI YRNNQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLS GWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGQVQL VQWGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSR INSDGSSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE LRWGNWGQGTLVTVSS	212

Dominio de Anticuerpo	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
4.16	QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSYYVYWYQQVPGAAPKLL MRLNNQRPSGVPDRFSGAKSGTSASLVISGLRSEDEADYYCAAWDDS LSGQWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGQ VQLQQWGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSRINSDGSSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARELRWGNWGQGTLVTVSS	213
4.17	QAGLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLI YRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDASLS GWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQL VQWGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSR INSDGSSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE LRWGNWGQGTLVTVSS	214
3.228	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNL WVFGGGTKLTVL SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEVQLVESGGGIVQPGGSL RLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYATYYADS VKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFA HWGQGTLVTVSS	215

Dominios de unión anti-PSMA

También se proporcionan anticuerpos anti-PSMA, fragmentos de los mismos y proteínas de fusión que comprenden tales anticuerpos y/o fragmentos.

En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona composiciones de paTCE que comprenden un dominio de unión de la primera porción que se une al marcador específico de tumor PSMA y un segundo dominio de unión que se une a un antígeno de célula efectora, tal como el antígeno CD3.

En algunas modalidades, el dominio de unión de la primera porción es un dominio VHH. En la Tabla 6f se proporcionan ejemplos no limitantes de secuencias del dominio VHH. En algunas modalidades, el dominio de unión con afinidad de unión por el marcador específico de tumor PSMA es un dominio VHH, enumerado en la Tabla 6f. En algunas modalidades, el dominio de unión con afinidad de unión por PSMA es un dominio VHH que comprende tres CDR de un dominio VHH enumerado en la Tabla 6f.

En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona una composición de paTCE que comprende un dominio de unión de la primera porción con afinidad de unión por el marcador específico de tumor PSMA que comprende secuencias VHH anti-PSMA expuestas en la Tabla 6f. En algunas modalidades, la unión tiene un valor de K_D de aproximadamente 10^{-10} a 10^{-7} M, según se determina en un ensayo de unión *in vitro*. En algunas modalidades, la unión tiene un valor de K_D de aproximadamente 44 nM, según se determina en un ensayo de unión *in vitro*. Se prevé específicamente que la composición de paTCE pueda comprender cualquiera de los dominios de unión divulgados en el presente documento o variantes de secuencia de los mismos siempre que las variantes presenten especificidad de unión al antígeno descrito.

Tabla 6f. Secuencias de VHH anti-PSMA

Nombre de Anticuerpo	**Número AC**	**Secuencia VHH**	**SEQ ID NO:**
PSMA.301	AC3703	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	500
PSMA.302	AC3704	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	501
PSMA.303	AC3705	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	502
PSMA.304	AC3706	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	503
PSMA.305	AC3707	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	504

Nombre de Anticuerpo	Número AC	Secuencia VHH	SEQ ID NO:
PSMA.306	AC3708	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	505
PSMA.307	AC3709	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	506
PSMA.308	AC3710	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAASNKWYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	507
PSMA.309	AC3711	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYFCAASNKWYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	508
PSMA.310	AC3712	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCGGSNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	509
PSMA.312	AC3714	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCGASNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	511
PSMA.314	AC3716	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAASNKDYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	513
PSMA.315	AC3717	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAASNKEYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	514
PSMA.316	AC3718	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAASNKGYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	515
PSMA.331	AC3733	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YFCGASNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	530
PSMA.332	AC3734	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YFCAGSNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	531

Nombre de Anticuerpo	Número AC	Secuencia VHH	SEQ ID NO:
PSMA.334	AC3736	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YFCAASNKDYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	533
PSMA.335	AC3737	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YFCAASNKEYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	534
PSMA.336	AC3738	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YFCAASNKGYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	535
PSMA.344	AC3746	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVS DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YFCGGSNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVT VSS	543
PSMA.345	AC3747	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCGGSNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	544
PSMA.347	AC3749	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCGASNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	546
PSMA.348	AC3750	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAASNKRYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	547
PSMA.349	AC3751	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAASNKDYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	548
PSMA.350	AC3752	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAASNKEYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	549
PSMA.351	AC3753	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAASNKGYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	550
PSMA.353	AC3755	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYFCGASNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	552

Nombre de Anticuerpo	Número AC	Secuencia VHH	SEQ ID NO:
PSMA.354	AC3756	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYFCAASNKRYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	553
PSMA.355	AC3757	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYFCAASNKDYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	554
PSMA.356	AC3758	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYFCAASNKEYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	555
PSMA.357	AC3759	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYFCAASNKGYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	556
PSMA.358	AC3760	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGI YVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKV SDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYFCGGSNKLYGRTWYDFNESDYWGQGTQV TVSS	557

En algunas modalidades, la divulgación proporciona una región VHH de anticuerpo anti-PSMA que comprende las siguientes CDR: una CDR1 de la región VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG; una CDR2 de la región VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRKVSDSVKG; y una CDR3 de la región VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AASNKEYGRTWYDFNESDY.

En algunas modalidades, la región VHH del anticuerpo anti-PSMA comprende las siguientes regiones marco (FR): una FR1 de la región VHH con una secuencia de

aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS; una FR2 de la región VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WFRQAPGKEREFVG; una FR3 de la región VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC; y una FR4 de la región VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTQVTVSS.

En algunas modalidades, la divulgación proporciona una región VHH de anticuerpo anti-PSMA que comprende la secuencia QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMS WSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGRT WYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549), o las CDR de la misma.

Aunque En algunas modalidades el dominio de unión con afinidad de unión por PSMA es un dominio VHH, se contempla que en otras modalidades se use un dominio de unión que comprenda regiones VL y VH de, o derivadas de, un anticuerpo monoclonal contra PSMA. En la Tabla 6g se presentan ejemplos ilustrativos no limitantes de secuencias de VL y VH. En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona una composición de paTCE que comprende un dominio de unión de la primera porción con afinidad de unión por el marcador específico de tumor PSMA que comprende secuencias de VH y VL anti-PSMA expuestas en la Tabla 6g. En algunas modalidades,

la presente divulgación proporciona una composición de paTCE que comprende un dominio de unión de la primera porción con afinidad de unión por el marcador específico de tumor PSMA que comprende la región CDR-L1, la región CDR-L2, la región CDR-L3, la región CDR-H1, la región CDR-H2 y la región CDR-H3, en donde cada una deriva de las respectivas secuencias de VL y VH establecidas en la Tabla 6g. En algunas modalidades, la unión tiene un valor de K_D de aproximadamente 10^{-10} a 10^{-7} M, según se determina en un ensayo de unión in vitro. Se prevé específicamente que la composición de paTCE pueda comprender uno cualquiera de los dominios de unión divulgados en el presente documento o variantes de secuencia de los mismos siempre que las variantes presenten especificidad de unión al antígeno descrito.

Tabla 6g. Secuencias de VH y VL anti-PSMA

Diana	**Secuencia VH**	**SEQ ID NO:**	**Secuencia VL**	**SEQ ID NO:**
PSMA	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQAPGKGLEWVAIISDGGYYTYYSDIIKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGTLVTVSS	**560**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYRYSDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQSEDFATYYCQQYDSYPYTFGGGTKLEIK	**561**
PSMA	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDGGYYTYYSDIIKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGTLVTVSS	**562**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK	**563**

En algunas modalidades, un dominio de anticuerpo anti-PSMA comprende una región VH que comprende la secuencia QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQAPGKGLEWVAIISDGGYYTYYSDIIKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 560), o las CDR de la misma, y una región VL

que comprende la secuencia DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYR YSDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQSEDFATYYCQQYDSYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 561), o las CDR de la misma. En algunas modalidades, un dominio de anticuerpo anti-PSMA comprende la siguiente secuencia: QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQAPGKGLEWVAIISD GGYYTYYSDIIKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYRYSDVPSRFSGSASGTDFTLTISSV QSEDFATYYCQQYDSYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 564).

En algunas modalidades, un dominio anticuerpo anti-PSMA comprende una región VH que comprende la secuencia QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISD GGYYTYYSDIIKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 562), o las CDR de la misma, y una región VL que comprende la secuencia DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYV YWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK (SEQ ID NO: 563), o las CDR de la misma. En algunas modalidades, un dominio de anticuerpo anti-PSMA comprende la siguiente secuencia: QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISD GGYYTYYSDIIKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAM DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISSV QSEDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK (SEQ ID NO: 565).

Conectores y espaciadores entre regiones de anticuerpos en anticuerpos biespecíficos

En algunas modalidades de los polipéptidos de esta divulgación, un par de región variable de cadena ligera (VL) y región variable de cadena pesada (VH) de un fragmento de unión a antígeno se puede conectar mediante un conector, o un conector largo (p. ej., de aminoácidos hidrófilos). En algunas modalidades, un primer fragmento de unión a antígeno (AF1) (p. ej., un dominio VHH, tal como un dominio VHH anti-PSMA) y un segundo fragmento de unión a antígeno (AF2) (p. ej., un scFv, tal como un scFv anti-CD3) se conectan mediante un conector, o un conector largo (p. ej., de aminoácidos hidrófilos). En algunas modalidades, un conector que conecta la región variable de cadena ligera (VL) y la región variable de cadena pesada (VH) de un fragmento de unión a antígeno (p. ej., un primer fragmento de unión a antígeno (AF1) y/o un segundo fragmento de unión a antígeno (AF2)), puede comprender (cada uno independientemente) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en la Tabla A. En algunas modalidades, un conector que conecta la región variable de cadena ligera (VL) y la región variable de cadena pesada (VH) de un fragmento de unión a antígeno (p. ej., un primer fragmento de unión a antígeno (AF1) y/o un segundo fragmento de unión a antígeno (AF2)), puede comprender (cada uno independientemente) una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia expuesta en la Tabla A. En algunas modalidades de los polipéptidos de esta divulgación, dos fragmentos de unión a antígeno (p. ej., un primer y un segundo fragmentos de unión a antígeno) se pueden fusionar entre sí mediante un conector

peptídico, o un conector corto. En algunas modalidades, el conector peptídico que conecta dos fragmentos de unión a antígeno (p. ej., un primer y un segundo fragmentos de unión a antígeno), puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en la Tabla B. En algunas modalidades, el conector peptídico que conecta dos fragmentos de unión a antígeno (p. ej., un primer y un segundo fragmentos de unión a antígeno), puede comprender una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia expuesta en la Tabla B. En algunos casos, el primer fragmento de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). En algunos casos, el segundo fragmento de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). Los dos fragmentos variables de cadena sencilla del primer y segundo fragmentos de unión a antígeno se pueden conectar entre sí mediante el conector peptídico. En algunas modalidades de los polipéptidos de esta divulgación, el conector utilizado para conectar el VHH del primer fragmento de unión a antígeno (p. ej., un VHH anti-PSMA) y el conector utilizado para conectar el VL y VH del segundo fragmento de unión a antígeno (p. ej., un scFv anti-CD3) pueden ser GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 125) de la Tabla A. En otras modalidades, el conector utilizado para conectar los VL y VH de un fragmento de unión a antígeno (p. ej., un scFv anti-CD3) puede ser SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81). En algunas modalidades, la divulgación proporciona polipéptidos que comprenden un dianticuerpo de cadena sencilla en el que después del plegamiento, el primer dominio (VL o VH) se empareja con el último dominio (VH o VL) para formar un scFv y los dos dominios del centro se emparejan para formar el otro scFv en el que el primer y segundo dominios, así como el tercer y último

dominios, se fusionan entre sí mediante un conector corto de aminoácidos hidrófilos identificados en el presente documento mediante las secuencias expuestas en la Tabla B y el segundo y el tercer dominios variables se fusionan mediante un conector largo identificado en la Tabla A. En algunas modalidades, la selección del conector corto y el conector largo es para prevenir el emparejamiento incorrecto de dominios variables adyacentes, facilitando de ese modo la formación de la configuración de cadena sencilla que comprende los VL y VH del primer radical de unión y el segundo radical de unión.

Tabla A: Conectores largos intramoleculares

Núm. de Conector	**Nombre**	**SEQ ID**	**Secuencia de Aminoácidos**
L1	(G4S)3	112	GGGGSGGGGSGGGGS
L2	MT110_18	113	GEGTSTGSGGSGGSGGAD
L3	MT103_18	114	VEGGSGGSGGSGGSGGVD
L4	UCHT1_29	115	RTSGPGDGGKGGPGKGPGGEGTKGTGPGG
L5	Y30	116	GSGEGSEGEGGGEGSEGEGSGEGGEGEGSG
L6	Y32	117	TGSGEGSEGEGGGEGSEGEGSGEGGEGEGSGT
L7	G1_30_3	118	GATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEG
L8	G9_30_1	119	GSAAPTAGTTPSASPAPPTGGSSAAGSPST
L9	Y30_modificado	120	GEGGESGGSEGEGSGEGEGGSGGEGESEGG
L10	G1_30_1	121	STETSPSTPTESPEAGSGSGSPESPSGTEA
L11	G1_30_2	122	PTGTTGEPSGEGSEPEGSAPTSSTSEATPS
L12	G1_30_4	123	SESESEGEAPTGPGASTTPEPSESPTPETS
L13	UCHT1_modificado	124	PEGGESGEGTGPGTGGEPEGEGGPGGEGGT

Tabla B: Conectores cortos intermoleculares

Nombre	Secuencia de Aminoácidos
S-1	GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 125)
S-2	SGGGGS (SEQ ID NO: 86)
S-3	GGGGS (SEQ ID NO: 87)
S-4	GGS
S-5	GSP

Espaciadores y segmentos de liberación de TCE

En el presente documento se incluyen proteínas de fusión que comprenden componentes de TCE que se vuelven biológicamente activos o tienen un aumento en la actividad biológica tras la liberación de un ELNN mediante la escisión de una secuencia de escisión opcional incorporada dentro de secuencias espaciadoras opcionales en la proteína de fusión, p. ej., como se describe en el presente documento.

En algunas modalidades, el espaciador puede proporcionarse para mejorar la expresión de la proteína de fusión a partir de una célula anfitriona y/o para disminuir el impedimento estérico de modo que el componente de TCE pueda asumir su estructura terciaria deseada y/o interactuar apropiadamente con su molécula diana. Para espaciadores y métodos para identificar espaciadores deseables, véase, por ejemplo, George, et al. (2003) Protein Engineering 15:871-879, incorporada específicamente como referencia en el presente documento. En algunas modalidades, el espaciador comprende una o más secuencias peptídicas que tienen entre 1 y 50 restos de aminoácidos de longitud, o de aproximadamente 1 a 25 restos, o de aproximadamente 1 a 10 restos de longitud. Las secuencias espaciadoras,

excluyendo los sitios de escisión, pueden comprender cualquiera de los 20 aminoácidos L naturales, y preferiblemente comprenderán aminoácidos hidrófilos que no están estéricamente obstaculizados y que pueden incluir, pero sin limitarse a, glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P). En algunas modalidades, el espaciador puede ser una poliglicina o polialanina, o predominantemente una mezcla de combinaciones de restos de glicina y alanina. En algunas modalidades, el polipéptido espaciador exclusivo de una secuencia de escisión está sustancialmente desprovisto de estructura secundaria. En algunas modalidades, una o ambas secuencias espaciadoras en una composición de proteína de fusión de paTCE pueden contener cada una adicionalmente una secuencia de escisión, que puede ser idéntica o puede ser diferente, en donde una proteasa puede actuar sobre la secuencia de escisión para liberar el TCE de la proteína de fusión.

Tabla C: Espaciadores ilustrativos entre un segmento de liberación y un dominio de anticuerpo biespecífico

Secuencia de Aminoácidos	**SEQ ID NO:**
STEPS	89
SATPESGPGT	90
ATSGSETPGT	91
GTAEAASASG	92
STEPSEGSAPGTS	93
SGPGTS	94
GTSTEPS	95
GTSESATPES	96
GTATPESGPG	97

En algunas modalidades de los polipéptidos de esta divulgación, un segmento de liberación (RS) (p. ej., un primer segmento de liberación (RS1), un segundo segmento de liberación (RS2), etc.) se puede fusionar a un dominio de anticuerpo biespecífico (BsAb) mediante un espaciador. En algunas modalidades, un espaciador puede (cada uno de forma independiente) comprender al menos 4 tipos de aminoácidos que son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P). En algunas modalidades, los péptidos de esta divulgación pueden comprender un primer segmento de liberación fusionado al dominio de anticuerpo biespecífico mediante un primer espaciador y un segundo segmento de liberación fusionado al dominio de anticuerpo biespecífico mediante un segundo espaciador. En algunas modalidades, un espaciador (*p. ej.*, un primer espaciador, un segundo espaciador, etc.) puede comprender (cada uno independientemente) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 80 %, al menos (aproximadamente) 90 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador (*p. ej.*, el primer espaciador, el segundo espaciador, etc.) puede (cada uno independientemente) comprender una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia expuesta en la Tabla C.

En algunas modalidades, la incorporación de la secuencia de escisión a una proteína de fusión está diseñada para permitir la liberación de un TCE que se vuelve activo o más activo tras su liberación de uno o más ELNN. En algunas modalidades, las secuencias de escisión están ubicadas suficientemente cerca de las secuencias de TCE, generalmente a 18, o a 12, o dentro de 6, o a 2 aminoácidos del extremo de la secuencia de TCE, de modo que cualquier resto restante anclado al TCE después de la escisión no interfiera apreciablemente en

la actividad (p. ej., tal como la unión a un receptor) del TCE, pero proporcione suficiente acceso a la proteasa para poder efectuar la escisión de la secuencia de escisión. En algunas modalidades, el sitio de escisión es una secuencia que puede escindirse mediante una proteasa endógena del sujeto mamífero de modo que un paTCE puede escindirse después de la administración a un sujeto. En tales casos, el paTCE puede servir como depósito circulante de TCE. Los ejemplos de sitios de escisión contemplados en el presente documento incluyen, pero sin limitarse a, una secuencia polipeptídica escindible por una proteasa endógena de mamífero enumerada en la Tabla 7.

En algunas modalidades, una proteína de fusión de paTCE comprende secuencias espaciadoras que comprenden una o más secuencias de escisión configuradas para liberar el TCE de la proteína de fusión cuando actúa sobre ella una proteasa. En algunas modalidades, una secuencia espaciadora no comprende una secuencia de escisión. En algunas modalidades, las una o más secuencias de escisión pueden ser una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 % (p. ej., al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con una secuencia de la Tabla 8a o b.

En algunas modalidades, la divulgación proporciona polipéptidos de segmentos de liberación de TCE (o segmentos de liberación (RS)) que son sustratos para una o más proteasas de mamíferos asociadas con o producidas por tejidos enfermos o células que se encuentran cerca de tejidos enfermos. Tales proteasas pueden incluir, pero sin limitarse a, las clases de proteasas tales como metaloproteinasas, cisteína

proteasas, aspartato proteasas y serina proteasas, incluidas, pero sin limitarse a, las proteasas de la Tabla 7. Los RS son útiles para, entre otras cosas, la incorporación a los polipéptidos recombinantes en cuestión, confiriendo un formato inactivo que puede activarse mediante la escisión de los RS por proteasas de mamíferos. Como se describe en el presente documento, los RS se incorporan a las composiciones de polipéptidos recombinantes en cuestión, conectando los radicales de unión incorporados al ELNN (cuyas configuraciones ilustrativas se describen en el presente documento) de manera que tras la escisión de los RS por la acción de las una o más proteasas para las cuales los RS son sustratos, los radicales de unión y ELNN se liberan de la composición y los radicales de unión, que ya no están protegidos por el ELNN, recuperan todo su potencial para unirse a sus ligandos.

Tabla 7: Proteasas de tejidos diana

Clase de Proteasas	**Proteasa**
Metaloproteinasas	Meprina
	Neprilisina (CD10)
	PSMA
	BMP-1
	Una Desintegrina y Metaloproteinasas (ADAM)
	ADAM8
	ADAM9
	ADAM10
	ADAM12
	ADAM15
	ADAM17 (TACE)
	ADAM19
	ADAM28 (MDC-L)
	ADAM con motivos de trombospondina (ADAMTS)
	ADAMTS1
	ADAMTS4
	ADAMTS5
	Metaloproteinasas de la Matriz (MMPs)

Clase de Proteasas	**Proteasa**
	MMP-1 (Colagenasa 1)
	MMP-2 (Gelatinasa A)
	MMP-3 (m1)
	MMP-7 (Matrilisina 1)
	MMP-8 (Colagenasa 2)
	MMP-9 (Gelatinasa B)
	MMP-10 (Estromelisina 2)
	MMP-11(Estromelisina 3)
	MMP-12 (Elastasa de Macrófagos)
	MMP-13 (Colagenasa 3)
	MMP-14 (MT1-MMP)
	MMP-15 (MT2-MMP)
	MMP-19
	MMP-23 (CA-MMP)
	MMP-24 (MT5-MMP)
	MMP-26 (Matrilisina 2)
	MMP-27 (CMMP)
Cisteína Proteasas	Legumaína
	Cisteína catepsinas
	Catepsina B
	Catepsina C
	Catepsina K
	Catepsina L
	Catepsina S
	Catepsina X
Aspartato Proteasas	Catepsina D
	Catepsina E
	Secretasa
Serina Proteasas	Uroquinasa (uPA)
	Activador de plasminógeno tisular (tPA)
	Plasmina
	Trombina
	Antígeno específico de próstata (PSA, KLK3)
	Elastasa de neutrófilos humanos (HNE)
	Elastasa
	Triptasa
	Serina proteasas transmembrana tipo II (TTSP)
	DESC1
	Hepsina (HPN)

Clase de Proteasas	Proteasa
	Matriptasa
	Matriptasa-2
	TMPRSS2
	TMPRSS3
	TMPRSS4 (CAP2)
	Proteína de Activación de Fibroblastos (FAP)
	Peptidasa relacionada con calicreína (familia KLK)
	KLK4
	KLK5
	KLK6
	KLK7
	KLK8
	KLK10
	KLK11
	KLK13
	KLK14

En algunas modalidades, la divulgación proporciona polipéptidos recombinantes activables que comprenden una secuencia del primer segmento de liberación (RS1) que tiene al menos 88 %, o al menos 94 % o 100 % de identidad de secuencia, cuando está óptimamente alineada, con una secuencia identificada en la Tabla 8a, en donde el RS1 es un sustrato para una o más proteasas de mamíferos. En algunas modalidades, el RS se modifica genéticamente adicionalmente para eliminar un sitio de escisión por legumaína. En algunas modalidades, la divulgación proporciona polipéptidos recombinantes activables que comprenden un RS1 y una secuencia del segundo segmento de liberación (RS2), teniendo cada uno al menos 88 %, o al menos 94 % o 100 % de identidad de secuencia, cuando está óptimamente alineada, con una secuencia identificada en el presente documento por las secuencias expuestas en la Tabla 8a, en donde RS1 y RS2 son cada uno un sustrato para una o más proteasas de mamífero. En

algunas modalidades, RS1 y RS2 no sirven cada uno como sustratos para legumaína.

En algunas modalidades, la divulgación proporciona polipéptidos recombinantes activables que comprenden una primera secuencia RS (RS1) que tiene al menos 90 %, al menos 93 %, al menos 97 % o 100 % de identidad, cuando está alineada de forma óptima, con una secuencia identificada en la Tabla 8b, en donde el RS1 es un sustrato para una o más proteasas de mamíferos. En algunas modalidades, la divulgación proporciona polipéptidos recombinantes activables que comprenden un RS1 y una secuencia del segundo segmento de liberación (RS2), teniendo cada uno al menos 88 %, o al menos 94 % o 100 % de identidad de secuencia, cuando está óptimamente alineada, con una secuencia identificada en el presente documento por las secuencias expuestas en la Tabla 8b, en donde RS1 y RS2 son cada uno un sustrato para una o más proteasas de mamífero (p. ej., en uno, dos o tres sitios de escisión dentro de cada secuencia de segmento de liberación). En algunas modalidades de polipéptidos recombinantes activables que comprenden RS1 y RS2, los dos segmentos de liberación pueden ser idénticos. En algunas modalidades de polipéptidos recombinantes activables que comprenden RS1 y RS2, los dos segmentos de liberación pueden ser diferentes.

La presente divulgación contempla segmentos de liberación que son sustratos para una, dos o tres clases diferentes de proteasas que son metaloproteinasas, cisteína proteasas, aspartato proteasas o serina proteasas, incluidas las proteasas de la Tabla 7. En algunas modalidades, un paTCE comprende RS (p. ej., RS1 y RS2) que sirven como sustratos para una o más proteasas que se encuentran en estrecha asociación o están colocalizadas con tumores o células cancerosas, y tras la escisión de los RS, los radicales de unión que de otro modo

están protegidos por los ELNN del paTCE (y por lo tanto tienen una menor afinidad de unión por sus respectivos ligandos) se liberan de los ELNN y recuperan todo su potencial para unirse a ligandos de células diana y efectoras. En algunas modalidades, un paTCE comprende RS (p. ej., RS1 y RS2), que comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos que es un sustrato para una o más proteasas celulares ubicadas dentro de una célula diana, que incluye, pero sin limitarse a, una proteasa de la Tabla 7. En algunas modalidades, los RS son sustratos para dos o tres clases de proteasas que escinden diferentes porciones de cada RS. En algunas modalidades, cada RS que es un sustrato para dos, tres o más clases de proteasas tiene dos, tres o más sitios de escisión distintos, pero la escisión por una única proteasa da como resultado la liberación de los radicales de unión de un ELNN.

En algunas modalidades, un RS de la divulgación para su incorporación a una proteína de fusión (tal como un paTCE) es un sustrato para una o más proteasas que incluyen, pero sin limitarse a, meprina, neprilisina (CD10), PSMA, BMP-1, una desintegrina y metaloproteinasas (ADAM), ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17 (TACE), ADAM19, ADAM28 (MDC-L), ADAM con motivos de trombospondina (ADAMTS), ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, MMP-1 (colagenasa 1), metaloproteinasa de matriz-1 (MMP-1), metaloproteinasa de matriz-2 (MMP-2, gelatinasa A), metaloproteinasa de matriz-3 (MMP-3, estromelisina 1), metaloproteinasa de matriz-7 (MMP-7, Matrilisina 1), metaloproteinasa de matriz-8 (MMP-8, colagenasa 2), metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9, gelatinasa B), metaloproteinasa de matriz-10 (MMP-10, estromelisina 2), metaloproteinasa de matriz-11 (MMP-11, estromelisina 3), metaloproteinasa de matriz-12 (MMP-12, elastasa de macrófagos), metaloproteinasa de matriz-13 (MMP-13, colagenasa 3),

metaloproteinasa de matriz-14 (MMP-14, MT1-MMP), metaloproteinasa de matriz-15 (MMP-15, MT2-MMP), metaloproteinasa de matriz-19 (MMP-19), metaloproteinasa de matriz-23 (MMP-23, CA-MMP), metaloproteinasa de matriz-24 (MMP-24, MT5-MMP), metaloproteinasa de matriz-26 (MMP-26, matrilisina 2), metaloproteinasa de matriz-27 (MMP-27, CMMP), legumaína, catepsina B, catepsina C, catepsina K, catepsina L, catepsina S, catepsina X, catepsina D, catepsina E, secretasa, uroquinasa (uPA), activador del plasminógeno tisular (tPA), plasmina, trombina, antígeno específico de próstata (PSA, KLK3), elastasa de neutrófilos humanos (HNE), elastasa, triptasa, Serina proteasas transmembrana de tipo II (TTSP), DESC1, hepsina (HPN), matriptasa, matriptasa-2, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4 (CAP2), proteína de activación de fibroblastos (FAP), peptidasa relacionada con calicreína (familia KLK), KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13 y KLK14. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para ADAM17. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para BMP-1. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para catepsina. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para HtrA1. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para legumaína. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MMP-1. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MMP-2. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MMP-7. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MMP-9. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MMP-11. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MMP-14. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para uPA. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para matriptasa. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MT-SP1. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para elastasa de neutrófilos. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para trombina. En algunas modalidades, RS es un sustrato para TMPRSS3. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para

TMPRSS4. En algunas modalidades, el RS de las composiciones de polipéptidos recombinantes en cuestión es un sustrato para al menos dos proteasas que incluyen, pero sin limitarse a, legumaína, MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-14, uPA y matriptasa. En algunas modalidades, el RS de las composiciones de polipéptidos recombinantes en cuestión es un sustrato para legumaína, MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-14, uPA y matriptasa. En modalidades específicas, el RS de las composiciones de polipéptidos recombinantes en cuestión no es un sustrato para la legumaína. En algunas modalidades, el RS de las composiciones de polipéptidos recombinantes en cuestión es un sustrato para uPA, matriptasa (también conocida como MT-SP1 y ST14), MMP2, MMP7, MMP9 y MMP14. En algunas modalidades, el RS de las composiciones de polipéptidos recombinantes en cuestión es sustrato para uPA, matriptasa, MMP2, MMP7, MMP9 y MMP14, pero no para legumaína.

Tabla 8a: Secuencias de segmento de liberación de TCE.

Nombre	**Secuencia de Aminoácidos**	**SEQ ID NO**
RSR-1517	EAGRSANHEPLGLVAT	**7001**
BSRS-A1-1	ASGRSTNAGPSGLAGP	**7002**
BSRS-A2-1	ASGRSTNAGPQGLAGQ	**7003**
BSRS-A3-1	ASGRSTNAGPPGLTGP	**7004**
VP-1	ASSRGTNAGPAGLTGP	**7005**
RSR-1752	ASSRTTNTGPSTLTGP	**7006**
RSR-1512	AAGRSDNGTPLELVAP	**7007**
RSR-1517	EAGRSANHEPLGLVAT	**7008**
VP-2	ASGRGTNAGPAGLTGP	**7009**
RSR-1018	LFGRNDNHEPLELGGG	**7010**
RSR-1053	TAGRSDNLEPLGLVFG	**7011**
RSR-1059	LDGRSDNFHPPELVAG	**7012**
RSR-1065	LEGRSDNEEPENLVAG	**7013**
RSR-1167	LKGRSDNNAPLALVAG	**7014**
RSR-1201	VYSRGTNAGPHGLTGR	**7015**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
RSR-1218	ANSRGTNKGFAGLIGP	**7016**
RSR-1226	ASSRLTNEAPAGLTIP	**7017**
RSR-1254	DQSRGTNAGPEGLTDP	**7018**
RSR-1256	ESSRGTNIGQGGLTGP	**7019**
RSR-1261	SSSRGTNQDPAGLTIP	**7020**
RSR-1293	ASSRGQNHSPMGLTGP	**7021**
RSR-1309	AYSRGPNAGPAGLEGR	**7022**
RSR-1326	ASERGNNAGPANLTGF	**7023**
RSR-1345	ASHRGTNPKPAILTGP	**7024**
RSR-1354	MSSRRTNANPAQLTGP	**7025**
RSR-1426	GAGRTDNHEPLELGAA	**7026**
RSR-1478	LAGRSENTAPLELTAG	**7027**
RSR-1479	LEGRPDNHEPLALVAS	**7028**
RSR-1496	LSGRSDNEEPLALPAG	**7029**
RSR-1508	EAGRTDNHEPLELSAP	**7030**
RSR-1513	EGGRSDNHGPLELVSG	**7031**
RSR-1516	LSGRSDNEAPLELEAG	**7032**
RSR-1524	LGGRADNHEPPELGAG	**7033**
RSR-1622	PPSRGTNAEPAGLTGE	**7034**
RSR-1629	ASTRGENAGPAGLEAP	**7035**
RSR-1664	ESSRGTNGAPEGLTGP	**7036**
RSR-1667	ASSRATNESPAGLTGE	**7037**
RSR-1709	ASSRGENPPPGGLTGP	**7038**
RSR-1712	AASRGTNTGPAELTGS	**7039**
RSR-1727	AGSRTTNAGPGGLEGP	**7040**
RSR-1754	APSRGENAGPATLTGA	**7041**
RSR-1819	ESGRAANTGPPTLTAP	**7042**
RSR-1832	NPGRAANEGPPGLPGS	**7043**
RSR-1855	ESSRAANLTPPELTGP	**7044**
RSR-1911	ASGRAANETPPGLTGA	**7045**
RSR-1929	NSGRGENLGAPGLTGT	**7046**
RSR-1951	TTGRAANLTPAGLTGP	**7047**
RSR-2295	EAGRSANHTPAGLTGP	**7048**
RSR-2298	ESGRAANTTPAGLTGP	**7049**
RSR-2038	TTGRATEAANLTPAGLTGP	**7050**
RSR-2072	TTGRAEEAANLTPAGLTGP	**7051**
RSR-2089	TTGRAGEAANLTPAGLTGP	**7052**
RSR-2302	TTGRATEAANATPAGLTGP	**7053**
RSR-3047	TTGRAGEAEGATSAGATGP	**7054**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
RSR-3052	TTGEAGEAANATSAGATGP	**7055**
RSR-3043	TTGEAGEAAGLTPAGLTGP	**7056**
RSR-3041	TTGAAGEAANATPAGLTGP	**7057**
RSR-3044	TTGRAGEAAGLTPAGLTGP	**7058**
RSR-3057	TTGRAGEAANATSAGATGP	**7059**
RSR-3058	TTGEAGEAAGATSAGATGP	**7060**
RSR-2485	ESGRAANTEPPELGAG	**7061**
RSR-2486	ESGRAANTAPEGLTGP	**7062**
RSR-2488	EPGRAANHEPSGLTEG	**7063**
RSR-2599	ESGRAANHTGAPPGGLTGP	**7064**
RSR-2706	TTGRTGEGANATPGGLTGP	**7065**
RSR-2707	RTGRSGEAANETPEGLEGP	**7066**
RSR-2708	RTGRTGESANETPAGLGGP	**7067**
RSR-2709	STGRTGEPANETPAGLSGP	**7068**
RSR-2710	TTGRAGEPANATPTGLSGP	**7069**
RSR-2711	RTGRPGEGANATPTGLPGP	**7070**
RSR-2712	RTGRGGEAANATPSGLGGP	**7071**
RSR-2713	STGRSGESANATPGGLGGP	**7072**
RSR-2714	RTGRTGEEANATPAGLPGP	**7073**
RSR-2715	ATGRPGEPANTTPEGLEGP	**7074**
RSR-2716	STGRSGEPANATPGGLTGP	**7075**
RSR-2717	PTGRGGEGANTTPTGLPGP	**7076**
RSR-2718	PTGRSGEGANATPSGLTGP	**7077**
RSR-2719	TTGRASEGANSTPAPLTEP	**7078**
RSR-2720	TYGRAAEAANTTPAGLTAP	**7079**
RSR-2721	TTGRATEGANATPAELTEP	**7080**
RSR-2722	TVGRASEEANTTPASLTGP	**7081**
RSR-2723	TTGRAPEAANATPAPLTGP	**7082**
RSR-2724	TWGRATEPANATPAPLTSP	**7083**
RSR-2725	TVGRASESANATPAELTSP	**7084**
RSR-2726	TVGRAPEGANSTPAGLTGP	**7085**
RSR-2727	TWGRATEAPNLEPATLTTP	**7086**
RSR-2728	TTGRATEAPNLTPAPLTEP	**7087**
RSR-2729	TQGRATEAPNLSPAALTSP	**7088**
RSR-2730	TQGRAAEAPNLTPATLTAP	**7089**
RSR-2731	TSGRAPEATNLAPAPLTGP	**7090**
RSR-2732	TQGRAAEAANLTPAGLTEP	**7091**
RSR-2733	TTGRAGSAPNLPPTGLTTP	**7092**
RSR-2734	TTGRAGGAENLPPEGLTAP	**7093**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
RSR-2735	TTSRAGTATNLTPEGLTAP	**7094**
RSR-2736	TTGRAGTATNLPPSGLTTP	**7095**
RSR-2737	TTARAGEAENLSPSGLTAP	**7096**
RSR-2738	TTGRAGGAGNLAPGGLTEP	**7097**
RSR-2739	TTGRAGTATNLPPEGLTGP	**7098**
RSR-2740	TTGRAGGAANLAPTGLTEP	**7099**
RSR-2741	TTGRAGTAENLAPSGLTTP	**7100**
RSR-2742	TTGRAGSATNLGPGGLTGP	**7101**
RSR-2743	TTARAGGAENLTPAGLTEP	**7102**
RSR-2744	TTARAGSAENLSPSGLTGP	**7103**
RSR-2745	TTARAGGAGNLAPEGLTTP	**7104**
RSR-2746	TTSRAGAAENLTPTGLTGP	**7105**
RSR-2747	TYGRTTTPGNEPPASLEAE	**7106**
RSR-2748	TYSRGESGPNEPPPGLTGP	**7107**
RSR-2749	AWGRTGASENETPAPLGGE	**7108**
RSR-2750	RWGRAETTPNTPPEGLETE	**7109**
RSR-2751	ESGRAANHTGAEPPELGAG	**7110**
RSR-2754	TTGRAGEAANLTPAGLTES	**7111**
RSR-2755	TTGRAGEAANLTPAALTES	**7112**
RSR-2756	TTGRAGEAANLTPAPLTES	**7113**
RSR-2757	TTGRAGEAANLTPEPLTES	**7114**
RSR-2758	TTGRAGEAANLTPAGLTGA	**7115**
RSR-2759	TTGRAGEAANLTPEGLTGA	**7116**
RSR-2760	TTGRAGEAANLTPEPLTGA	**7117**
RSR-2761	TTGRAGEAANLTPAGLTEA	**7118**
RSR-2762	TTGRAGEAANLTPEGLTEA	**7119**
RSR-2763	TTGRAGEAANLTPAPLTEA	**7120**
RSR-2764	TTGRAGEAANLTPEPLTEA	**7121**
RSR-2765	TTGRAGEAANLTPEPLTGP	**7122**
RSR-2766	TTGRAGEAANLTPAGLTGG	**7123**
RSR-2767	TTGRAGEAANLTPEGLTGG	**7124**
RSR-2768	TTGRAGEAANLTPEALTGG	**7125**
RSR-2769	TTGRAGEAANLTPEPLTGG	**7126**
RSR-2770	TTGRAGEAANLTPAGLTEG	**7127**
RSR-2771	TTGRAGEAANLTPEGLTEG	**7128**
RSR-2772	TTGRAGEAANLTPAPLTEG	**7129**
RSR-2773	TTGRAGEAANLTPEPLTEG	**7130**
RSR-3213	EAGRSASHTPAGLTGP	**7628**

Tabla 8b: Secuencias de segmentos de liberación

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-0001	GSAPGSAGGYAELRM GGAIATSGSETPGT	**7131**	RSC-0001	GTAEAASASGGSAG GYAELRMGGAIPGSP	**7379**
RSN-0002	GSAPGTGGGYAPLRM GGGAATSGSETPGT	**7132**	RSC-0002	GTAEAASASGGTGG GYAPLRMGGGAPGS P	**7380**
RSN-0003	GSAPGAEGGYAALRM GGEIATSGSETPGT	**7133**	RSC-0003	GTAEAASASGGAEG GYAALRMGGEIPGSP	**7381**
RSN-0004	GSAPGGPGGYALLRM GGPAATSGSETPGT	**7134**	RSC-0004	GTAEAASASGGGPG GYALLRMGGPAPGSP	**7382**
RSN-0005	GSAPGEAGGYAFLRM GGSIATSGSETPGT	**7135**	RSC-0005	GTAEAASASGGEAG GYAFLRMGGSIPGSP	**7383**
RSN-0006	GSAPGPGGGYASLRM GGTAATSGSETPGT	**7136**	RSC-0006	GTAEAASASGGPGG GYASLRMGGTAPGS P	**7384**
RSN-0007	GSAPGSEGGYATLRM GGAIATSGSETPGT	**7137**	RSC-0007	GTAEAASASGGSEG GYATLRMGGAIPGSP	**7385**
RSN-0008	GSAPGTPGGYANLRM GGGAATSGSETPGT	**7138**	RSC-0008	GTAEAASASGGTPGG YANLRMGGGAPGSP	**7386**
RSN-0009	GSAPGASGGYAHLRM GGEIATSGSETPGT	**7139**	RSC-0009	GTAEAASASGGASG GYAHLRMGGEIPGSP	**7387**
RSN-0010	GSAPGGTGGYGELRM GGPAATSGSETPGT	**7140**	RSC-0010	GTAEAASASGGGTG GYGELRMGGPAPGS P	**7388**
RSN-0011	GSAPGEAGGYPELRM GGSIATSGSETPGT	**7141**	RSC-0011	GTAEAASASGGEAG GYPELRMGGSIPGSP	**7389**
RSN-0012	GSAPGPGGGYVELRM GGTAATSGSETPGT	**7142**	RSC-0012	GTAEAASASGGPGG GYVELRMGGTAPGS P	**7390**
RSN-0013	GSAPGSEGGYLELRM GGAIATSGSETPGT	**7143**	RSC-0013	GTAEAASASGGSEG GYLELRMGGAIPGSP	**7391**
RSN-0014	GSAPGTPGGYSELRM GGGAATSGSETPGT	**7144**	RSC-0014	GTAEAASASGGTPGG YSELRMGGGAPGSP	**7392**
RSN-0015	GSAPGASGGYTELRM GGEIATSGSETPGT	**7145**	RSC-0015	GTAEAASASGGASG GYTELRMGGEIPGSP	**7393**
RSN-0016	GSAPGGTGGYQELRM GGPAATSGSETPGT	**7146**	RSC-0016	GTAEAASASGGGTG GYQELRMGGPAPGS P	**7394**
RSN-0017	GSAPGEAGGYEELRM GGSIATSGSETPGT	**7147**	RSC-0017	GTAEAASASGGEAG GYEELRMGGSIPGSP	**7395**
RSN-0018	GSAPGPGIGPAELRMG GTAATSGSETPGT	**7148**	RSC-0018	GTAEAASASGGPGIG PAELRMGGTAPGSP	**7396**
RSN-0019	GSAPGSEIGAAELRMG GAIATSGSETPGT	**7149**	RSC-0019	GTAEAASASGGSEIG AAELRMGGAIPGSP	**7397**
RSN-0020	GSAPGTPIGSAELRMG GGAATSGSETPGT	**7150**	RSC-0020	GTAEAASASGGTPIG SAELRMGGGAPGSP	**7398**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-0021	GSAPGASIGTAELRMG GEIATSGSETPGT	**7151**	RSC-0021	GTAEAASASGGASIG TAELRMGGEIPGSP	**7399**
RSN-0022	GSAPGGTIGNAELRMG GPAATSGSETPGT	**7152**	RSC-0022	GTAEAASASGGGTIG NAELRMGGPAPGSP	**7400**
RSN-0023	GSAPGEAIGQAELRMG GSIATSGSETPGT	**7153**	RSC-0023	GTAEAASASGGEAIG QAELRMGGSIPGSP	**7401**
RSN-0024	GSAPGPGGPYAELRM GGTAATSGSETPGT	**7154**	RSC-0024	GTAEAASASGGPGG PYAELRMGGTAPGSP	**7402**
RSN-0025	GSAPGSEGAYAELRM GGAIATSGSETPGT	**7155**	RSC-0025	GTAEAASASGGSEGA YAELRMGGAIPGSP	**7403**
RSN-0026	GSAPGTPGVYAELRM GGGAATSGSETPGT	**7156**	RSC-0026	GTAEAASASGGTPGV YAELRMGGGAPGSP	**7404**
RSN-0027	GSAPGASGLYAELRM GGEIATSGSETPGT	**7157**	RSC-0027	GTAEAASASGGASGL YAELRMGGEIPGSP	**7405**
RSN-0028	GSAPGGTGIYAELRMG GPAATSGSETPGT	**7158**	RSC-0028	GTAEAASASGGGTGI YAELRMGGPAPGSP	**7406**
RSN-0029	GSAPGEAGFYAELRM GGSIATSGSETPGT	**7159**	RSC-0029	GTAEAASASGGEAGF YAELRMGGSIPGSP	**7407**
RSN-0030	GSAPGPGGYYAELRM GGTAATSGSETPGT	**7160**	RSC-0030	GTAEAASASGGPGG YYAELRMGGTAPGSP	**7408**
RSN-0031	GSAPGSEGSYAELRM GGAIATSGSETPGT	**7161**	RSC-0031	GTAEAASASGGSEGS YAELRMGGAIPGSP	**7409**
RSN-0032	GSAPGTPGNYAELRM GGGAATSGSETPGT	**7162**	RSC-0032	GTAEAASASGGTPGN YAELRMGGGAPGSP	**7410**
RSN-0033	GSAPGASGEYAELRM GGEIATSGSETPGT	**7163**	RSC-0033	GTAEAASASGGASGE YAELRMGGEIPGSP	**7411**
RSN-0034	GSAPGGTGHYAELRM GGPAATSGSETPGT	**7164**	RSC-0034	GTAEAASASGGGTG HYAELRMGGPAPGS P	**7412**
RSN-0035	GSAPGEAGGYAEARM GGSIATSGSETPGT	**7165**	RSC-0035	GTAEAASASGGEAG GYAEARMGGSIPGSP	**7413**
RSN-0036	GSAPGPGGGYAEVRM GGTAATSGSETPGT	**7166**	RSC-0036	GTAEAASASGGPGG GYAEVRMGGTAPGS P	**7414**
RSN-0037	GSAPGSEGGYAEIRM GGAIATSGSETPGT	**7167**	RSC-0037	GTAEAASASGGSEG GYAEIRMGGAIPGSP	**7415**
RSN-0038	GSAPGTPGGYAEFRM GGGAATSGSETPGT	**7168**	RSC-0038	GTAEAASASGGTPGG YAEFRMGGGAPGSP	**7416**
RSN-0039	GSAPGASGGYAEYRM GGEIATSGSETPGT	**7169**	RSC-0039	GTAEAASASGGASG GYAEYRMGGEIPGSP	**7417**
RSN-0040	GSAPGGTGGYAESRM GGPAATSGSETPGT	**7170**	RSC-0040	GTAEAASASGGGTG GYAESRMGGPAPGS P	**7418**
RSN-0041	GSAPGEAGGYAETRM GGSIATSGSETPGT	**7171**	RSC-0041	GTAEAASASGGEAG GYAETRMGGSIPGSP	**7419**
RSN-0042	GSAPGPGGGYAELAM GGTRATSGSETPGT	**7172**	RSC-0042	GTAEAASASGGPGG GYAELAMGGTRPGS P	**7420**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-0043	GSAPGSEGGYAELVMGGARATSGSETPGT	**7173**	RSC-0043	GTAEAASASGGSEGGYAELVMGGARPGSP	**7421**
RSN-0044	GSAPGTPGGYAELLMGGGRATSGSETPGT	**7174**	RSC-0044	GTAEAASASGGTPGGYAELLMGGGRPGSP	**7422**
RSN-0045	GSAPGASGGYAELIMGGERATSGSETPGT	**7175**	RSC-0045	GTAEAASASGGASGGYAELIMGGERPGSP	**7423**
RSN-0046	GSAPGGTGGYAELWMGGPRATSGSETPGT	**7176**	RSC-0046	GTAEAASASGGGTGGYAELWMGGPRPGSP	**7424**
RSN-0047	GSAPGEAGGYAELSMGGSRATSGSETPGT	**7177**	RSC-0047	GTAEAASASGGEAGGYAELSMGGSRPGSP	**7425**
RSN-0048	GSAPGPGGGYAELTMGGTRATSGSETPGT	**7178**	RSC-0048	GTAEAASASGGPGGGYAELTMGGTRPGSP	**7426**
RSN-0049	GSAPGSEGGYAELQMGGARATSGSETPGT	**7179**	RSC-0049	GTAEAASASGGSEGGYAELQMGGARPGSP	**7427**
RSN-0050	GSAPGTPGGYAELNMGGGRATSGSETPGT	**7180**	RSC-0050	GTAEAASASGGTPGGYAELNMGGGRPGSP	**7428**
RSN-0051	GSAPGASGGYAELEMGGERATSGSETPGT	**7181**	RSC-0051	GTAEAASASGGASGGYAELEMGGERPGSP	**7429**
RSN-0052	GSAPGGTGGYAELRPGGPIATSGSETPGT	**7182**	RSC-0052	GTAEAASASGGGTGGYAELRPGGPIPGSP	**7430**
RSN-0053	GSAPGEAGGYAELRAGGSAATSGSETPGT	**7183**	RSC-0053	GTAEAASASGGEAGGYAELRAGGSAPGSP	**7431**
RSN-0054	GSAPGPGGGYAELRLGGTIATSGSETPGT	**7184**	RSC-0054	GTAEAASASGGPGGGYAELRLGGTIPGSP	**7432**
RSN-0055	GSAPGSEGGYAELRIGGAAATSGSETPGT	**7185**	RSC-0055	GTAEAASASGGSEGGYAELRIGGAAPGSP	**7433**
RSN-0056	GSAPGTPGGYAELRSGGGIATSGSETPGT	**7186**	RSC-0056	GTAEAASASGGTPGGYAELRSGGGIPGSP	**7434**
RSN-0057	GSAPGASGGYAELRNGGEAATSGSETPGT	**7187**	RSC-0057	GTAEAASASGGASGGYAELRNGGEAPGSP	**7435**
RSN-0058	GSAPGGTGGYAELRQGGPIATSGSETPGT	**7188**	RSC-0058	GTAEAASASGGGTGGYAELRQGGPIPGSP	**7436**
RSN-0059	GSAPGEAGGYAELRDGGSAATSGSETPGT	**7189**	RSC-0059	GTAEAASASGGEAGGYAELRDGGSAPGSP	**7437**
RSN-0060	GSAPGPGGGYAELREGGTIATSGSETPGT	**7190**	RSC-0060	GTAEAASASGGPGGGYAELREGGTIPGSP	**7438**
RSN-0061	GSAPGSEGGYAELRHGGAAATSGSETPGT	**7191**	RSC-0061	GTAEAASASGGSEGGYAELRHGGAAPGSP	**7439**
RSN-0062	GSAPGTPGGYAELRMPGGIATSGSETPGT	**7192**	RSC-0062	GTAEAASASGGTPGGYAELRMPGGIPGSP	**7440**
RSN-0063	GSAPGASGGYAELRMAGEAATSGSETPGT	**7193**	RSC-0063	GTAEAASASGGASGGYAELRMAGEAPGSP	**7441**
RSN-0064	GSAPGGTGGYAELRMVGPIATSGSETPGT	**7194**	RSC-0064	GTAEAASASGGGTGGYAELRMVGPIPGSP	**7442**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-0065	GSAPGEAGGYAELRM LGSAATSGSETPGT	**7195**	RSC-0065	GTAEAASASGGEAG GYAELRMLGSAPGSP	**7443**
RSN-0066	GSAPGPGGGYAELRMI GTIATSGSETPGT	**7196**	RSC-0066	GTAEAASASGGPGG GYAELRMIGTIPGSP	**7444**
RSN-0067	GSAPGSEGGYAELRM YGAIATSGSETPGT	**7197**	RSC-0067	GTAEAASASGGSEG GYAELRMYGAIPGSP	**7445**
RSN-0068	GSAPGTPGGYAELRM SGGAATSGSETPGT	**7198**	RSC-0068	GTAEAASASGGTPGG YAELRMSGGAPGSP	**7446**
RSN-0069	GSAPGASGGYAELRM NGEIATSGSETPGT	**7199**	RSC-0069	GTAEAASASGGASG GYAELRMNGEIPGSP	**7447**
RSN-0070	GSAPGGTGGYAELRM QGPAATSGSETPGT	**7200**	RSC-0070	GTAEAASASGGGTG GYAELRMQGPAPGS P	**7448**
RSN-0071	GSAPGANHTPAGLTGP GARATSGSETPGT	**7201**	RSC-0071	GTAEAASASGGANHT PAGLTGPGARPGSP	**7449**
RSN-0072	GSAPGANTAPEGLTGP STRATSGSETPGT	**7202**	RSC-0072	GTAEAASASGGANTA PEGLTGPSTRPGSP	**7450**
RSN-0073	GSAPGTGAPPGGLTG PGTRATSGSETPGT	**7203**	RSC-0073	GTAEAASASGGTGAP PGGLTGPGTRPGSP	**7451**
RSN-0074	GSAPGANHEPSGLTE GSPRATSGSETPGT	**7204**	RSC-0074	GTAEAASASGGANHE PSGLTEGSPRPGSP	**7452**
RSN-0075	GSAPGANTEPPELGAG TERATSGSETPGT	**7205**	RSC-0075	GTAEAASASGGANTE PPELGAGTERPGSP	**7453**
RSN-0076	GSAPGASGPPPGLTG PPGRATSGSETPGT	**7206**	RSC-0076	GTAEAASASGGASGP PPGLTGPPGRPGSP	**7454**
RSN-0077	GSAPGASGTPAPLGG EPGRATSGSETPGT	**7207**	RSC-0077	GTAEAASASGGASGT PAPLGGEPGRPGSP	**7455**
RSN-0078	GSAPGPAGPPEGLETE AGRATSGSETPGT	**7208**	RSC-0078	GTAEAASASGGPAGP PEGLETEAGRPGSP	**7456**
RSN-0079	GSAPGPTSGQGGLTG PESRATSGSETPGT	**7209**	RSC-0079	GTAEAASASGGPTSG QGGLTGPESRPGSP	**7457**
RSN-0080	GSAPGSAGGAANLVR GGAIATSGSETPGT	**7210**	RSC-0080	GTAEAASASGGSAG GAANLVRGGAIPGSP	**7458**
RSN-0081	GSAPGTGGGAAPLVR GGGAATSGSETPGT	**7211**	RSC-0081	GTAEAASASGGTGG GAAPLVRGGGAPGS P	**7459**
RSN-0082	GSAPGAEGGAAALVR GGEIATSGSETPGT	**7212**	RSC-0082	GTAEAASASGGAEG GAAALVRGGEIPGSP	**7460**
RSN-0083	GSAPGGPGGAALLVR GGPAATSGSETPGT	**7213**	RSC-0083	GTAEAASASGGGPG GAALLVRGGPAPGSP	**7461**
RSN-0084	GSAPGEAGGAAFLVR GGSIATSGSETPGT	**7214**	RSC-0084	GTAEAASASGGEAG GAAFLVRGGSIPGSP	**7462**
RSN-0085	GSAPGPGGGAASLVR GGTAATSGSETPGT	**7215**	RSC-0085	GTAEAASASGGPGG GAASLVRGGTAPGSP	**7463**
RSN-0086	GSAPGSEGGAATLVR GGAIATSGSETPGT	**7216**	RSC-0086	GTAEAASASGGSEG GAATLVRGGAIPGSP	**7464**
RSN-0087	GSAPGTPGGAAGLVR GGGAATSGSETPGT	**7217**	RSC-0087	GTAEAASASGGTPGG AAGLVRGGGAPGSP	**7465**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-0088	GSAPGASGGAADLVR GGEIATSGSETPGT	**7218**	RSC-0088	GTAEAASASGGASG GAADLVRGGEIPGSP	**7466**
RSN-0089	GSAPGGTGGAGNLVR GGPAATSGSETPGT	**7219**	RSC-0089	GTAEAASASGGGTG GAGNLVRGGPAPGS P	**7467**
RSN-0090	GSAPGEAGGAPNLVR GGSIATSGSETPGT	**7220**	RSC-0090	GTAEAASASGGEAG GAPNLVRGGSIPGSP	**7468**
RSN-0091	GSAPGPGGGAVNLVR GGTAATSGSETPGT	**7221**	RSC-0091	GTAEAASASGGPGG GAVNLVRGGTAPGSP	**7469**
RSN-0092	GSAPGSEGGALNLVR GGAIATSGSETPGT	**7222**	RSC-0092	GTAEAASASGGSEG GALNLVRGGAIPGSP	**7470**
RSN-0093	GSAPGTPGGASNLVR GGGAATSGSETPGT	**7223**	RSC-0093	GTAEAASASGGTPGG ASNLVRGGGAPGSP	**7471**
RSN-0094	GSAPGASGGATNLVR GGEIATSGSETPGT	**7224**	RSC-0094	GTAEAASASGGASG GATNLVRGGEIPGSP	**7472**
RSN-0095	GSAPGGTGGAQNLVR GGPAATSGSETPGT	**7225**	RSC-0095	GTAEAASASGGGTG GAQNLVRGGPAPGS P	**7473**
RSN-0096	GSAPGEAGGAENLVR GGSIATSGSETPGT	**7226**	RSC-0096	GTAEAASASGGEAG GAENLVRGGSIPGSP	**7474**
RSN-1517	GSAPEAGRSANHEPL GLVATATSGSETPGT	**7227**	RSC-1517	GTAEAASASGEAGRS ANHEPLGLVATPGSP	**7475**
BSRS-A1-2	GSAPASGRSTNAGPS GLAGPATSGSETPGT	**7228**	BSRS-A1-3	GTAEAASASGASGRS TNAGPSGLAGPPGSP	**7476**
BSRS-A2-2	GSAPASGRSTNAGPQ GLAGQATSGSETPGT	**7229**	BSRS-A2-3	GTAEAASASGASGRS TNAGPQGLAGQPGS P	**7477**
BSRS-A3-2	GSAPASGRSTNAGPP GLTGPATSGSETPGT	**7230**	BSRS-A3-3	GTAEAASASGASGRS TNAGPPGLTGPPGSP	**7478**
VP-1	GSAPASSRGTNAGPA GLTGPATSGSETPGT	**7231**	VP-1	GTAEAASASGASSRG TNAGPAGLTGPPGSP	**7479**
RSN-1752	GSAPASSRTTNTGPST LTGPATSGSETPGT	**7232**	RSC-1752	GTAEAASASGASSRT TNTGPSTLTGPPGSP	**7480**
RSN-1512	GSAPAAGRSDNGTPLE LVAPATSGSETPGT	**7233**	RSC-1512	GTAEAASASGAAGRS DNGTPLELVAPPGSP	**7481**
RSN-1517	GSAPEAGRSANHEPL GLVATATSGSETPGT	**7234**	RSC-1517	GTAEAASASGEAGRS ANHEPLGLVATPGSP	**7482**
VP-2	GSAPASGRGTNAGPA GLTGPATSGSETPGT	**7235**	VP-2	GTAEAASASGASGRG TNAGPAGLTGPPGSP	**7483**
RSN-1018	GSAPLFGRNDNHEPLE LGGGATSGSETPGT	**7236**	RSC-1018	GTAEAASASGLFGRN DNHEPLELGGGPGSP	**7484**
RSN-1053	GSAPTAGRSDNLEPLG LVFGATSGSETPGT	**7237**	RSC-1053	GTAEAASASGTAGRS DNLEPLGLVFGPGSP	**7485**
RSN-1059	GSAPLDGRSDNFHPPE LVAGATSGSETPGT	**7238**	RSC-1059	GTAEAASASGLDGRS DNFHPPELVAGPGSP	**7486**
RSN-1065	GSAPLEGRSDNEEPEN LVAGATSGSETPGT	**7239**	RSC-1065	GTAEAASASGLEGRS DNEEPENLVAGPGSP	**7487**
RSN-1167	GSAPLKGRSDNNAPLA LVAGATSGSETPGT	**7240**	RSC-1167	GTAEAASASGLKGRS DNNAPLALVAGPGSP	**7488**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-1201	GSAPVYSRGTNAGPH GLTGRATSGSETPGT	**7241**	RSC-1201	GTAEAASASGVYSRG TNAGPHGLTGRPGSP	**7489**
RSN-1218	GSAPANSRGTNKGFA GLIGPATSGSETPGT	**7242**	RSC-1218	GTAEAASASGANSRG TNKGFAGLIGPPGSP	**7490**
RSN-1226	GSAPASSRLTNEAPAG LTIPATSGSETPGT	**7243**	RSC-1226	GTAEAASASGASSRL TNEAPAGLTIPPGSP	**7491**
RSN-1254	GSAPDQSRGTNAGPE GLTDPATSGSETPGT	**7244**	RSC-1254	GTAEAASASGDQSR GTNAGPEGLTDPPGS P	**7492**
RSN-1256	GSAPESSRGTNIGQGG LTGPATSGSETPGT	**7245**	RSC-1256	GTAEAASASGESSRG TNIGQGGLTGPPGSP	**7493**
RSN-1261	GSAPSSSRGTNQDPA GLTIPATSGSETPGT	**7246**	RSC-1261	GTAEAASASGSSSRG TNQDPAGLTIPPGSP	**7494**
RSN-1293	GSAPASSRGQNHSPM GLTGPATSGSETPGT	**7247**	RSC-1293	GTAEAASASGASSRG QNHSPMGLTGPPGS P	**7495**
RSN-1309	GSAPAYSRGPNAGPA GLEGRATSGSETPGT	**7248**	RSC-1309	GTAEAASASGAYSRG PNAGPAGLEGRPGSP	**7496**
RSN-1326	GSAPASERGNNAGPA NLTGFATSGSETPGT	**7249**	RSC-1326	GTAEAASASGASERG NNAGPANLTGFPGSP	**7497**
RSN-1345	GSAPASHRGTNPKPAI LTGPATSGSETPGT	**7250**	RSC-1345	GTAEAASASGASHRG TNPKPAILTGPPGSP	**7498**
RSN-1354	GSAPMSSRRTNANPA QLTGPATSGSETPGT	**7251**	RSC-1354	GTAEAASASGMSSRR TNANPAQLTGPPGSP	**7499**
RSN-1426	GSAPGAGRTDNHEPL ELGAAATSGSETPGT	**7252**	RSC-1426	GTAEAASASGGAGRT DNHEPLELGAAPGSP	**7500**
RSN-1478	GSAPLAGRSENTAPLE LTAGATSGSETPGT	**7253**	RSC-1478	GTAEAASASGLAGRS ENTAPLELTAGPGSP	**7501**
RSN-1479	GSAPLEGRPDNHEPLA LVASATSGSETPGT	**7254**	RSC-1479	GTAEAASASGLEGRP DNHEPLALVASPGSP	**7502**
RSN-1496	GSAPLSGRSDNEEPLA LPAGATSGSETPGT	**7255**	RSC-1496	GTAEAASASGLSGRS DNEEPLALPAGPGSP	**7503**
RSN-1508	GSAPEAGRTDNHEPLE LSAPATSGSETPGT	**7256**	RSC-1508	GTAEAASASGEAGRT DNHEPLELSAPPGSP	**7504**
RSN-1513	GSAPEGGRSDNHGPL ELVSGATSGSETPGT	**7257**	RSC-1513	GTAEAASASGEGGRS DNHGPLELVSGPGSP	**7505**
RSN-1516	GSAPLSGRSDNEAPLE LEAGATSGSETPGT	**7258**	RSC-1516	GTAEAASASGLSGRS DNEAPLELEAGPGSP	**7506**
RSN-1524	GSAPLGGRADNHEPP ELGAGATSGSETPGT	**7259**	RSC-1524	GTAEAASASGLGGRA DNHEPPELGAGPGSP	**7507**
RSN-1622	GSAPPPSRGTNAEPA GLTGEATSGSETPGT	**7260**	RSC-1622	GTAEAASASGPPSRG TNAEPAGLTGEPGSP	**7508**
RSN-1629	GSAPASTRGENAGPA GLEAPATSGSETPGT	**7261**	RSC-1629	GTAEAASASGASTRG ENAGPAGLEAPPGSP	**7509**
RSN-1664	GSAPESSRGTNGAPE GLTGPATSGSETPGT	**7262**	RSC-1664	GTAEAASASGESSRG TNGAPEGLTGPPGSP	**7510**
RSN-1667	GSAPASSRATNESPAG LTGEATSGSETPGT	**7263**	RSC-1667	GTAEAASASGASSRA TNESPAGLTGEPGSP	**7511**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-1709	GSAPASSRGENPPPG GLTGPATSGSETPGT	**7264**	RSC-1709	GTAEAASASGASSRG ENPPPGGLTGPPGSP	**7512**
RSN-1712	GSAPAASRGTNTGPAE LTGSATSGSETPGT	**7265**	RSC-1712	GTAEAASASGAASRG TNTGPAELTGSPGSP	**7513**
RSN-1727	GSAPAGSRTTNAGPG GLEGPATSGSETPGT	**7266**	RSC-1727	GTAEAASASGAGSRT TNAGPGGLEGPPGSP	**7514**
RSN-1754	GSAPAPSRGENAGPA TLTGAATSGSETPGT	**7267**	RSC-1754	GTAEAASASGAPSRG ENAGPATLTGAPGSP	**7515**
RSN-1819	GSAPESGRAANTGPPT LTAPATSGSETPGT	**7268**	RSC-1819	GTAEAASASGESGRA ANTGPPTLTAPPGSP	**7516**
RSN-1832	GSAPNPGRAANEGPP GLPGSATSGSETPGT	**7269**	RSC-1832	GTAEAASASGNPGRA ANEGPPGLPGSPGSP	**7517**
RSN-1855	GSAPESSRAANLTPPE LTGPATSGSETPGT	**7270**	RSC-1855	GTAEAASASGESSRA ANLTPPELTGPPGSP	**7518**
RSN-1911	GSAPASGRAANETPP GLTGAATSGSETPGT	**7271**	RSC-1911	GTAEAASASGASGRA ANETPPGLTGAPGSP	**7519**
RSN-1929	GSAPNSGRGENLGAP GLTGTATSGSETPGT	**7272**	RSC-1929	GTAEAASASGNSGR GENLGAPGLTGTPGS P	**7520**
RSN-1951	GSAPTTGRAANLTPAG LTGPATSGSETPGT	**7273**	RSC-1951	GTAEAASASGTTGRA ANLTPAGLTGPPGSP	**7521**
RSN-2295	GSAPEAGRSANHTPA GLTGPATSGSETPGT	**7274**	RSC-2295	GTAEAASASGEAGRS ANHTPAGLTGPPGSP	**7522**
RSN-2298	GSAPESGRAANTTPAG LTGPATSGSETPGT	**7275**	RSC-2298	GTAEAASASGESGRA ANTTPAGLTGPPGSP	**7523**
RSN-2038	GSAPTTGRATEAANLT PAGLTGPATSGSETPG T	**7276**	RSC-2038	GTAEAASASGTTGRA TEAANLTPAGLTGPP GSP	**7524**
RSN-2072	GSAPTTGRAEEAANLT PAGLTGPATSGSETPG T	**7277**	RSC-2072	GTAEAASASGTTGRA EEAANLTPAGLTGPP GSP	**7525**
RSN-2089	GSAPTTGRAGEAANLT PAGLTGPATSGSETPG T	**7278**	RSC-2089	GTAEAASASGTTGRA GEAANLTPAGLTGPP GSP	**7526**
RSN-2302	GSAPTTGRATEAANAT PAGLTGPATSGSETPG T	**7279**	RSC-2302	GTAEAASASGTTGRA TEAANATPAGLTGPP GSP	**7527**
RSN-3047	GSAPTTGRAGEAEGAT SAGATGPATSGSETPG T	**7280**	RSC-3047	GTAEAASASGTTGRA GEAEGATSAGATGPP GSP	**7528**
RSN-3052	GSAPTTGEAGEAANAT SAGATGPATSGSETPG T	**7281**	RSC-3052	GTAEAASASGTTGEA GEAANATSAGATGPP GSP	**7529**
RSN-3043	GSAPTTGEAGEAAGLT PAGLTGPATSGSETPG T	**7282**	RSC-3043	GTAEAASASGTTGEA GEAAGLTPAGLTGPP GSP	**7530**
RSN-3041	GSAPTTGAAGEAANAT PAGLTGPATSGSETPG T	**7283**	RSC-3041	GTAEAASASGTTGAA GEAANATPAGLTGPP GSP	**7531**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-3044	GSAPTTGRAGEAAGLTPAGLTGPATSGSETPGT	**7284**	RSC-3044	GTAEAASASGTTGRAGEAAGLTPAGLTGPPGSP	**7532**
RSN-3057	GSAPTTGRAGEAANATSAGATGPATSGSETPGT	**7285**	RSC-3057	GTAEAASASGTTGRAGEAANATSAGATGPPGSP	**7533**
RSN-3058	GSAPTTGEAGEAAGATSAGATGPATSGSETPGT	**7286**	RSC-3058	GTAEAASASGTTGEAGEAAGATSAGATGPPGSP	**7534**
RSN-2485	GSAPESGRAANTEPPELGAGATSGSETPGT	**7287**	RSC-2485	GTAEAASASGESGRAANTEPPELGAGPGSP	**7535**
RSN-2486	GSAPESGRAANTAPEGLTGPATSGSETPGT	**7288**	RSC-2486	GTAEAASASGESGRAANTAPEGLTGPPGSP	**7536**
RSN-2488	GSAPEPGRAANHEPSGLTEGATSGSETPGT	**7289**	RSC-2488	GTAEAASASGEPGRAANHEPSGLTEGPGSP	**7537**
RSN-2599	GSAPESGRAANHTGAPPGGLTGPATSGSETPGT	**7290**	RSC-2599	GTAEAASASGESGRAANHTGAPPGGLTGPPGSP	**7538**
RSN-2706	GSAPTTGRTGEGANATPGGLTGPATSGSETPGT	**7291**	RSC-2706	GTAEAASASGTTGRTGEGANATPGGLTGPPGSP	**7539**
RSN-2707	GSAPRTGRSGEAANETPEGLEGPATSGSETPGT	**7292**	RSC-2707	GTAEAASASGRTGRSGEAANETPEGLEGPPGSP	**7540**
RSN-2708	GSAPRTGRTGESANETPAGLGGPATSGSETPGT	**7293**	RSC-2708	GTAEAASASGRTGRTGESANETPAGLGGPPGSP	**7541**
RSN-2709	GSAPSTGRTGEPANETPAGLSGPATSGSETPGT	**7294**	RSC-2709	GTAEAASASGSTGRTGEPANETPAGLSGPPGSP	**7542**
RSN-2710	GSAPTTGRAGEPANATPTGLSGPATSGSETPGT	**7295**	RSC-2710	GTAEAASASGTTGRAGEPANATPTGLSGPPGSP	**7543**
RSN-2711	GSAPRTGRPGEGANATPTGLPGPATSGSETPGT	**7296**	RSC-2711	GTAEAASASGRTGRPGEGANATPTGLPGPPGSP	**7544**
RSN-2712	GSAPRTGRGGEAANATPSGLGGPATSGSETPGT	**7297**	RSC-2712	GTAEAASASGRTGRGGEAANATPSGLGGPPGSP	**7545**
RSN-2713	GSAPSTGRSGESANATPGGLGGPATSGSETPGT	**7298**	RSC-2713	GTAEAASASGSTGRSGESANATPGGLGGPPGSP	**7546**
RSN-2714	GSAPRTGRTGEEANATPAGLPGPATSGSETPGT	**7299**	RSC-2714	GTAEAASASGRTGRTGEEANATPAGLPGPPGSP	**7547**
RSN-2715	GSAPATGRPGEPANTTPEGLEGPATSGSETPGT	**7300**	RSC-2715	GTAEAASASGATGRPGEPANTTPEGLEGPPGSP	**7548**
RSN-2716	GSAPSTGRSGEPANATPGGLTGPATSGSETPGT	**7301**	RSC-2716	GTAEAASASGSTGRSGEPANATPGGLTGPPGSP	**7549**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-2717	GSAPPTGRGGEGANTTPTGLPGPATSGSETPGT	**7302**	RSC-2717	GTAEAASASGPTGRGGEGANTTPTGLPGPPGSP	**7550**
RSN-2718	GSAPPTGRSGEGANATPSGLTGPATSGSETPGT	**7303**	RSC-2718	GTAEAASASGPTGRSGEGANATPSGLTGPPGSP	**7551**
RSN-2719	GSAPTTGRASEGANSTPAPLTEPATSGSETPGT	**7304**	RSC-2719	GTAEAASASGTTGRASEGANSTPAPLTEPPGSP	**7552**
RSN-2720	GSAPTYGRAAEAANTTPAGLTAPATSGSETPGT	**7305**	RSC-2720	GTAEAASASGTYGRAAEAANTTPAGLTAPPGSP	**7553**
RSN-2721	GSAPTTGRATEGANATPAELTEPATSGSETPGT	**7306**	RSC-2721	GTAEAASASGTTGRATEGANATPAELTEPPGSP	**7554**
RSN-2722	GSAPTVGRASEEANTTPASLTGPATSGSETPGT	**7307**	RSC-2722	GTAEAASASGTVGRASEEANTTPASLTGPPGSP	**7555**
RSN-2723	GSAPTTGRAPEAANATPAPLTGPATSGSETPGT	**7308**	RSC-2723	GTAEAASASGTTGRAPEAANATPAPLTGPPGSP	**7556**
RSN-2724	GSAPTWGRATEPANATPAPLTSPATSGSETPGT	**7309**	RSC-2724	GTAEAASASGTWGRATEPANATPAPLTSPPGSP	**7557**
RSN-2725	GSAPTVGRASESANATPAELTSPATSGSETPGT	**7310**	RSC-2725	GTAEAASASGTVGRASESANATPAELTSPPGSP	**7558**
RSN-2726	GSAPTVGRAPEGANSTPAGLTGPATSGSETPGT	**7311**	RSC-2726	GTAEAASASGTVGRAPEGANSTPAGLTGPPGSP	**7559**
RSN-2727	GSAPTWGRATEAPNLEPATLTTPATSGSETPGT	**7312**	RSC-2727	GTAEAASASGTWGRATEAPNLEPATLTTPPGSP	**7560**
RSN-2728	GSAPTTGRATEAPNLTPAPLTEPATSGSETPGT	**7313**	RSC-2728	GTAEAASASGTTGRATEAPNLTPAPLTEPPGSP	**7561**
RSN-2729	GSAPTQGRATEAPNLSPAALTSPATSGSETPGT	**7314**	RSC-2729	GTAEAASASGTQGRATEAPNLSPAALTSPPGSP	**7562**
RSN-2730	GSAPTQGRAAEAPNLTPATLTAPATSGSETPGT	**7315**	RSC-2730	GTAEAASASGTQGRAAEAPNLTPATLTAPPGSP	**7563**
RSN-2731	GSAPTSGRAPEATNLAPAPLTGPATSGSETPGT	**7316**	RSC-2731	GTAEAASASGTSGRAPEATNLAPAPLTGPPGSP	**7564**
RSN-2732	GSAPTQGRAAEAANLTPAGLTEPATSGSETPGT	**7317**	RSC-2732	GTAEAASASGTQGRAAEAANLTPAGLTEPPGSP	**7565**
RSN-2733	GSAPTTGRAGSAPNLPPTGLTTPATSGSETPGT	**7318**	RSC-2733	GTAEAASASGTTGRAGSAPNLPPTGLTTPPGSP	**7566**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-2734	GSAPTTGRAGGAENLPPEGLTAPATSGSETPGT	**7319**	RSC-2734	GTAEAASASGTTGRAGGAENLPPEGLTAPPGSP	**7567**
RSN-2735	GSAPTTSRAGTATNLTPEGLTAPATSGSETPGT	**7320**	RSC-2735	GTAEAASASGTTSRAGTATNLTPEGLTAPPGSP	**7568**
RSN-2736	GSAPTTGRAGTATNLPPSGLTTPATSGSETPGT	**7321**	RSC-2736	GTAEAASASGTTGRAGTATNLPPSGLTTPPGSP	**7569**
RSN-2737	GSAPTTARAGEAENLSPSGLTAPATSGSETPGT	**7322**	RSC-2737	GTAEAASASGTTARAGEAENLSPSGLTAPPGSP	**7570**
RSN-2738	GSAPTTGRAGGAGNLAPGGLTEPATSGSETPGT	**7323**	RSC-2738	GTAEAASASGTTGRAGGAGNLAPGGLTEPPGSP	**7571**
RSN-2739	GSAPTTGRAGTATNLPPEGLTGPATSGSETPGT	**7324**	RSC-2739	GTAEAASASGTTGRAGTATNLPPEGLTGPPGSP	**7572**
RSN-2740	GSAPTTGRAGGAANLAPTGLTEPATSGSETPGT	**7325**	RSC-2740	GTAEAASASGTTGRAGGAANLAPTGLTEPPGSP	**7573**
RSN-2741	GSAPTTGRAGTAENLAPSGLTTPATSGSETPGT	**7326**	RSC-2741	GTAEAASASGTTGRAGTAENLAPSGLTTPPGSP	**7574**
RSN-2742	GSAPTTGRAGSATNLGPGGLTGPATSGSETPGT	**7327**	RSC-2742	GTAEAASASGTTGRAGSATNLGPGGLTGPPGSP	**7575**
RSN-2743	GSAPTTARAGGAENLTPAGLTEPATSGSETPGT	**7328**	RSC-2743	GTAEAASASGTTARAGGAENLTPAGLTEPPGSP	**7576**
RSN-2744	GSAPTTARAGSAENLSPSGLTGPATSGSETPGT	**7329**	RSC-2744	GTAEAASASGTTARAGSAENLSPSGLTGPPGSP	**7577**
RSN-2745	GSAPTTARAGGAGNLAPEGLTTPATSGSETPGT	**7330**	RSC-2745	GTAEAASASGTTARAGGAGNLAPEGLTTPPGSP	**7578**
RSN-2746	GSAPTTSRAGAAENLTPTGLTGPATSGSETPGT	**7331**	RSC-2746	GTAEAASASGTTSRAGAAENLTPTGLTGPPGSP	**7579**
RSN-2747	GSAPTYGRTTTPGNEPPASLEAEATSGSETPGT	**7332**	RSC-2747	GTAEAASASGTYGRTTTPGNEPPASLEAEPGSP	**7580**
RSN-2748	GSAPTYSRGESGPNEPPPGLTGPATSGSETPGT	**7333**	RSC-2748	GTAEAASASGTYSRGESGPNEPPPGLTGPPGSP	**7581**
RSN-2749	GSAPAWGRTGASENETPAPLGGEATSGSETPGT	**7334**	RSC-2749	GTAEAASASGAWGRTGASENETPAPLGGEPGSP	**7582**
RSN-2750	GSAPRWGRAETTPNTPPEGLETEATSGSETPGT	**7335**	RSC-2750	GTAEAASASGRWGRAETTPNTPPEGLETEPGSP	**7583**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-2751	GSAPESGRAANHTGAEPPELGAGATSGSETPGT	**7336**	RSC-2751	GTAEAASASGESGRAANHTGAEPPELGAGPGSP	**7584**
RSN-2754	GSAPTTGRAGEAANLTPAGLTESATSGSETPGT	**7337**	RSC-2754	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPAGLTESPGSP	**7585**
RSN-2755	GSAPTTGRAGEAANLTPAALTESATSGSETPGT	**7338**	RSC-2755	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPAALTESPGSP	**7586**
RSN-2756	GSAPTTGRAGEAANLTPAPLTESATSGSETPGT	**7339**	RSC-2756	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPAPLTESPGSP	**7587**
RSN-2757	GSAPTTGRAGEAANLTPEPLTESATSGSETPGT	**7340**	RSC-2757	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPEPLTESPGSP	**7588**
RSN-2758	GSAPTTGRAGEAANLTPAGLTGAATSGSETPGT	**7341**	RSC-2758	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPAGLTGAPGSP	**7589**
RSN-2759	GSAPTTGRAGEAANLTPEGLTGAATSGSETPGT	**7342**	RSC-2759	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPEGLTGAPGSP	**7590**
RSN-2760	GSAPTTGRAGEAANLTPEPLTGAATSGSETPGT	**7343**	RSC-2760	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPEPLTGAPGSP	**7591**
RSN-2761	GSAPTTGRAGEAANLTPAGLTEAATSGSETPGT	**7344**	RSC-2761	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPAGLTEAPGSP	**7592**
RSN-2762	GSAPTTGRAGEAANLTPEGLTEAATSGSETPGT	**7345**	RSC-2762	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPEGLTEAPGSP	**7593**
RSN-2763	GSAPTTGRAGEAANLTPAPLTEAATSGSETPGT	**7346**	RSC-2763	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPAPLTEAPGSP	**7594**
RSN-2764	GSAPTTGRAGEAANLTPEPLTEAATSGSETPGT	**7347**	RSC-2764	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPEPLTEAPGSP	**7595**
RSN-2765	GSAPTTGRAGEAANLTPEPLTGPATSGSETPGT	**7348**	RSC-2765	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPEPLTGPPGSP	**7596**
RSN-2766	GSAPTTGRAGEAANLTPAGLTGGATSGSETPGT	**7349**	RSC-2766	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPAGLTGGPGSP	**7597**
RSN-2767	GSAPTTGRAGEAANLTPEGLTGGATSGSETPGT	**7350**	RSC-2767	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPEGLTGGPGSP	**7598**
RSN-2768	GSAPTTGRAGEAANLTPEALTGGATSGSETPGT	**7351**	RSC-2768	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPEALTGGPGSP	**7599**
RSN-2769	GSAPTTGRAGEAANLTPEPLTGGATSGSETPGT	**7352**	RSC-2769	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPEPLTGGPGSP	**7600**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-2770	GSAPTTGRAGEAANLTPAGLTEGATSGSETPGT	**7353**	RSC-2770	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPAGLTEGPGSP	**7601**
RSN-2771	GSAPTTGRAGEAANLTPEGLTEGATSGSETPGT	**7354**	RSC-2771	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPEGLTEGPGSP	**7602**
RSN-2772	GSAPTTGRAGEAANLTPAPLTEGATSGSETPGT	**7355**	RSC-2772	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPAPLTEGPGSP	**7603**
RSN-2773	GSAPTTGRAGEAANLTPEPLTEGATSGSETPGT	**7356**	RSC-2773	GTAEAASASGTTGRAGEAANLTPEPLTEGPGSP	**7604**
RSN-3047	GSAPTTGRAGEAEGATSAGATGPATSGSETPGT	**7357**	RSC-3047	GTAEAASASGTTGRAGEAEGATSAGATGPPGSP	**7605**
RSN-2783	GSAPEAGRSAEATSAGATGPATSGSETPGT	**7358**	RSC-2783	GTAEAASASGEAGRSAEATSAGATGPPGSP	**7606**
RSN-3107	GSAPSASGTYSRGESGPGSPATSGSETPGT	**7359**	RSC-3107	GTAEAASASGSASGTYSRGESGPGSPPGSP	**7607**
RSN-3103	GSAPSASGEAGRTDTHPGSPATSGSETPGT	**7360**	RSC-3103	GTAEAASASGSASGEAGRTDTHPGSPPGSP	**7608**
RSN-3102	GSAPSASGEPGRAAEHPGSPATSGSETPGT	**7361**	RSC-3102	GTAEAASASGSASGEPGRAAEHPGSPPGSP	**7609**
RSN-3119	GSAPSPAGESSRGTTIAGSPATSGSETPGT	**7362**	RSC-3119	GTAEAASASGSPAGESSRGTTIAGSPPGSP	**7610**
RSN-3043	GSAPTTGEAGEAAGLTPAGLTGPATSGSETPGT	**7363**	RSC-3043	GTAEAASASGTTGEAGEAAGLTPAGLTGPPGSP	**7611**
RSN-2789	GSAPEAGESAGATPAGLTGPATSGSETPGT	**7364**	RSC-2789	GTAEAASASGEAGESAGATPAGLTGPPGSP	**7612**
RSN-3109	GSAPSASGAPLELEAGPGSPATSGSETPGT	**7365**	RSC-3109	GTAEAASASGSASGAPLELEAGPGSPPGSP	**7613**
RSN-3110	GSAPSASGEPPELGAGPGSPATSGSETPGT	**7366**	RSC-3110	GTAEAASASGSASGEPPELGAGPGSPPGSP	**7614**
RSN-3111	GSAPSASGEPSGLTEGPGSPATSGSETPGT	**7367**	RSC-3111	GTAEAASASGSASGEPSGLTEGPGSPPGSP	**7615**
RSN-3112	GSAPSASGTPAPLTEPPGSPATSGSETPGT	**7368**	RSC-3112	GTAEAASASGSASGTPAPLTEPPGSPPGSP	**7616**
RSN-3113	GSAPSASGTPAELTEPPGSPATSGSETPGT	**7369**	RSC-3113	GTAEAASASGSASGTPAELTEPPGSPPGSP	**7617**
RSN-3114	GSAPSASGPPPGLTGPPGSPATSGSETPGT	**7370**	RSC-3114	GTAEAASASGSASGPPPGLTGPPGSPPGSP	**7618**
RSN-3115	GSAPSASGTPAPLGGEPGSPATSGSETPGT	**7371**	RSC-3115	GTAEAASASGSASGTPAPLGGEPGSPPGSP	**7619**
RSN-3125	GSAPSPAGAPEGLTGPAGSPATSGSETPGT	**7372**	RSC-3125	GTAEAASASGSPAGAPEGLTGPAGSPPGSP	**7620**
RSN-3126	GSAPSPAGPPEGLETEAGSPATSGSETPGT	**7373**	RSC-3126	GTAEAASASGSPAGPPEGLETEAGSPPGSP	**7621**

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
RSN-3127	GSAPSPTSGQGGLTG PGSEPATSGSETPGT	**7374**	RSC-3127	GTAEAASASGSPTSG QGGLTGPGSEPPGS P	**7622**
RSN-3131	GSAPSESAPPEGLETE STEPATSGSETPGT	**7375**	RSC-3131	GTAEAASASGSESAP PEGLETESTEPPGSP	**7623**
RSN-3132	GSAPSEGSEPLELGAA SETPATSGSETPGT	**7376**	RSC-3132	GTAEAASASGSEGSE PLELGAASETPPGSP	**7624**
RSN-3133	GSAPSEGSGPAGLEAP SETPATSGSETPGT	**7377**	RSC-3133	GTAEAASASGSEGSG PAGLEAPSETPPGSP	**7625**
RSN-3138	GSAPSEPTPPASLEAE PGSPATSGSETPGT	**7378**	RSC-3138	GTAEAASASGSEPTP PASLEAEPGSPPGSP	**7626**

En algunas modalidades, un paTCE comprende un RS1 y un RS2 que tienen diferentes velocidades de escisión y diferentes eficiencias de escisión para múltiples proteasas para las que son sustratos. Puesto que una proteasa determinada puede encontrarse a diferentes concentraciones en un tumor, en comparación con tejidos sanos o en la circulación, la divulgación proporciona RS que tienen una eficiencia de escisión mayor o menor para una proteasa determinada con el fin de garantizar que un paTCE se convierta preferentemente de la de forma inactiva a la forma activa (es decir, mediante la separación y liberación de los radicales de unión y ELNN del paTCE después de la escisión de los RS) cuando están cerca de la célula o tejido canceroso y sus proteasas colocalizadas en comparación con la tasa de escisión de los RS en tejido sano o en la circulación de modo que los radicales de unión liberados del TCE tengan una mayor capacidad para unirse a ligandos en el tumor en comparación con la forma inactiva que permanece en circulación. Mediante tales diseños selectivos, se puede mejorar el índice terapéutico de las composiciones resultantes, dando como resultado una reducción de efectos secundarios con respecto a las terapias convencionales que no incorporan tal activación específica del sitio.

En algunas modalidades, la eficiencia de escisión es el valor $\log_2$ de la razón entre el porcentaje del sustrato de prueba que comprende el RS escindido y el porcentaje del sustrato de control AC1611 escindido cuando cada uno se somete a la enzima proteasa en ensayos bioquímicos en los que la reacción se realiza en donde la concentración inicial de sustrato es 6 µM, las reacciones se incuban a 37 °C durante 2 horas antes de detenerse añadiendo EDTA, analizándose la cantidad de productos de la digestión y el sustrato no escindido mediante SDS-PAGE no reductora para establecer la razón del porcentaje escindido. La eficiencia de escisión se puede calcular de la siguiente manera:

$Log_2\left(\frac{\%\ Escindido\ para\ el\ sustrato\ \text{de}\ interés}{\%\ escindido\ para\ AC1611\ en\ el\ mismo\ experimento}\right)$. Así, una eficiencia de escisión de -1 significa que la cantidad de sustrato de prueba escindida fue de 50 % en comparación con la del sustrato de control, mientras que una eficiencia de escisión de +1 significa que la cantidad de sustrato de prueba escindida fue de 200 % en comparación con la del sustrato de control. Una tasa de escisión mayor por la proteasa de prueba con respecto al control daría como resultado una eficiencia de escisión mayor, y una tasa de escisión más lenta por la proteasa de prueba con respecto al control daría como resultado una eficiencia de escisión menor. Se estableció que una secuencia RS de control AC1611 (RSR-1517), que tiene la secuencia de aminoácidos EAGRSANHEPLGLVAT (SEQ ID NO: 7001) tenía una eficiencia de escisión de referencia adecuada mediante las proteasas legumaína, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, uPA y matriptasa, cuando se probaron en ensayos bioquímicos *in vitro* para determinar las tasas de escisión por proteasas individuales. Mediante la sustitución selectiva de aminoácidos en ubicaciones individuales en los péptidos RS, se crearon y evaluaron bibliotecas de RS frente al panel de las 7 proteasas, lo que dio como resultado perfiles que se utilizaron para establecer pautas para las sustituciones de

aminoácidos apropiadas con el fin de lograr RS con las eficiencias de escisión deseados. En algunas modalidades, al preparar RS con eficiencias de escisión deseadas, se prefieren las sustituciones que utilizan los aminoácidos hidrófilos A, E, G, P, S y T; sin embargo, se pueden sustituir otros L-aminoácidos en posiciones dadas para ajustar la eficiencia de escisión siempre que los RS conserven al menos cierta susceptibilidad a la escisión por una proteasa determinada. Las sustituciones conservativas de aminoácidos en un péptido para conservar o efectuar la actividad están dentro del conocimiento y las capacidades de un experto en la técnica. En algunas modalidades, la divulgación proporciona un RS en el que el RS se escinde mediante una proteasa que incluye, pero sin limitarse a, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, uPA o matriptasa (también conocida como MT-SP1) con una eficiencia de escisión al menos 0,2 $\log_2$, o 0,4 $\log_2$, o 0,8 $\log_2$, o 1,0 $\log_2$ mayor en un ensayo bioquímico competitivo *in vitro* en comparación con la escisión por la misma proteasa de una secuencia de control RSR-1517 que tiene la secuencia EAGRSANHEPLGLVAT (SEQ DNI NO. 7001). En algunas modalidades, la divulgación proporciona un RS en el que el RS se escinde mediante una proteasa que incluye, pero sin limitarse a, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-11, uPA o matriptasa con una eficiencia de escisión al menos 0,2 $\log_2$. o 0,4 $\log_2$, o 0,8 $\log_2$, o 1,0 $\log_2$ menor en un ensayo bioquímico competitivo *in vitro* en comparación con la escisión mediante la misma proteasa de una secuencia de control RSR-1517 que tiene la secuencia EAGRSANHEPLGLVAT (SEQ ID NO. 7001). En algunas modalidades, la divulgación proporciona un RS en el que la tasa de escisión del RS por una proteasa que incluye, pero sin limitarse a, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, uPA o matriptasa es al menos 2 veces, o al menos 4 veces, o al menos 8 veces, o al menos 16 veces más rápida en comparación con la secuencia de control RSR-1517 que tiene la secuencia

EAGRSANHEPLGLVAT (SEQ ID NO. 7001). En algunas modalidades, la divulgación proporciona un RS en el que la tasa de escisión del RS por una proteasa que incluye, pero sin limitarse a, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, uPA o matriptasa es al menos 2 veces, o al menos 4 veces, o al menos 8 veces, o al menos 16 veces más lenta en comparación con la secuencia de control RSR-1517 que tiene la secuencia EAGRSANHEPLGLVAT (SEQ ID NO. 7001).

En algunas modalidades, el RS comprende la secuencia de aminoácidos EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N. En algunas modalidades, X es S. En algunas modalidades, X es T. En algunas modalidades, X es Y. En algunas modalidades, X es Q. En algunas modalidades, X es G. En algunas modalidades, X es A. En algunas modalidades, X es V. En algunas modalidades, X es C. En algunas modalidades, X es P. En algunas modalidades, X es L. En algunas modalidades, X es I. En algunas modalidades, X es M. En algunas modalidades, X es F. En algunas modalidades, X es K. En algunas modalidades, es R. En algunas modalidades, X es H. En algunas modalidades, X es D. En algunas modalidades, X es E. En algunas modalidades, el RS no es escindido por la legumaína. En algunas modalidades, el RS no se puede escindir mediante legumaína en sangre, plasma o suero humanos. En algunas modalidades, el RS no se puede escindir tras la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS de forma menos rápida o eficiente de los que la legumaína escinde RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP). En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS a una velocidad que es inferior a aproximadamente 50 % de la velocidad a la que la legumaína escinde RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP). En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS a

una velocidad que es inferior a aproximadamente 25 % de la velocidad a la que la legumaína escinde RSR-2295. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS a una velocidad que es menos de aproximadamente 10 % de la velocidad a la que la legumaína escinde RSR-2295. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS a una velocidad que es menos de aproximadamente 5 % de la velocidad a la que la legumaína escinde RSR-2295. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS a una velocidad que es inferior a aproximadamente 2,5 % de la velocidad a la que la legumaína escinde RSR-2295.

En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS a una velocidad que es inferior a aproximadamente 50 % de la velocidad a la que la legumaína escinde RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) en plasma humano. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS a una velocidad que es inferior a aproximadamente 25 % de la velocidad a la que la legumaína escinde el RSR-2295 en plasma humano. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS a una velocidad que es inferior a aproximadamente 10 % de la velocidad a la que la legumaína escinde el RSR-2295 en plasma humano. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS a una velocidad que es inferior a aproximadamente 5 % de la velocidad a la que la legumaína escinde el RSR-2295 en plasma humano. En algunas modalidades, la legumaína escinde el RS a una velocidad que es inferior a aproximadamente 2,5 % de la velocidad a la que la legumaína escinde el RSR-2295 en plasma humano.

En algunas modalidades, la divulgación proporciona paTCE que comprenden múltiples RS, en donde cada secuencia de RS se identifica mediante el grupo de secuencias establecidas en la Tabla 8a y los RS están conectados entre sí mediante de 1 a 6 aminoácidos que son glicina, serina, alanina y treonina. En

algunas modalidades, un paTCE comprende un primer RS y un segundo RS diferentes del primer RS, en donde cada secuencia de RS se identifica en el presente documento mediante una secuencia expuesta en la Tabla 8a y los RS están conectados entre sí mediante 1 a 6 aminoácidos que son glicina, serina, alanina y treonina. En algunas modalidades, el paTCE comprende un primer RS, un segundo RS diferente del primer RS, y una tercer RS diferente del primer y el segundo RS, en donde cada secuencia se identifica mediante la secuencia establecida en la Tabla 8a y el primer y el segundo RS y el tercer RS están conectados entre sí por 1 a 6 aminoácidos que son glicina, serina, alanina y treonina. En algunas modalidades, se pueden concatenar múltiples RS del paTCE para formar una secuencia que se puede escindir mediante múltiples proteasas a diferentes velocidades o eficiencia de escisión. En algunas modalidades, la divulgación proporciona un paTCE que comprende un RS1 y un RS2, en donde cada uno tiene una secuencia establecida en la Tabla 8a u 8b y ELNN (p. ej., un ELNN1 y ELNN2), tales como los descritos en el presente documento, en donde el RS1 está fusionado entre el ELNN1 y los radicales de unión y el RS2 está fusionado entre ELNN2 y los radicales de unión. En algunas modalidades, un paTCE se escinde más fácilmente en tejidos diana que expresan múltiples proteasas (p. ej., tejidos tumorales), en comparación con tejidos sanos o cuando está en la circulación normal, con el resultado de que los fragmentos resultantes que portan los radicales de unión penetrarían más fácilmente el tejido diana; por ejemplo, un tumor, y tendrían una mejor capacidad para unir y conectar la célula cancerosa y la célula efectora.

En algunas modalidades, un paTCE comprende un primer segmento de liberación (RS1) colocado entre un primer ELNN y un anticuerpo biespecífico. En algunas

modalidades, el polipéptido comprende adicionalmente un segundo segmento de liberación (RS2) colocado entre el anticuerpo biespecífico y un segundo ELNN. En algunas modalidades, RS1 y RS2 tienen una secuencia idéntica. En algunas modalidades, RS1 y RS2 no tienen una secuencia idéntica. En algunas modalidades, el RS1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia identificada en el presente documento en la Tabla 8a u 8b o uno de sus subconjuntos. En algunas modalidades, el RS2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia identificada en la Tabla 8a u 8b o uno de sus subconjuntos. En algunas modalidades, RS1 y RS2 son cada uno un sustrato para la escisión mediante múltiples proteasas en uno, dos o tres sitios de escisión dentro de cada secuencia de segmento de liberación.

En algunas modalidades, el paTCE comprende adicionalmente uno o más fragmentos de referencia (p. ej., fragmentos de códigos de barras) liberables del paTCE tras la digestión por la proteasa. En algunas modalidades, los uno o más fragmentos de referencia son un único fragmento de referencia que tiene una secuencia y peso molecular diferentes de los de todos los demás fragmentos peptídicos que se pueden liberar del polipéptido tras la digestión del polipéptido por la proteasa.

paTCE ilustrativos

En algunas modalidades, un paTCE comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 80 % de identidad de secuencia con una secuencia

expuesta en la Tabla D (que consiste en SEQ ID NOS: 1000-1009) o uno de sus subconjuntos. En algunas modalidades, el paTCE comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en la Tabla D (SEQ ID NO: 1000-1009) o uno de sus subconjuntos. En algunas modalidades, el paTCE comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 90 %, al menos (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en la Tabla D (SEQ ID NOS: 1000-1009) o uno de sus subconjuntos. En algunas modalidades, el paTCE comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia expuesta en la Tabla D (SEQ ID NOS: 1000-1009). Se contempla específicamente que las composiciones de esta divulgación puedan comprender variantes de secuencia de las secuencias de aminoácidos

expuestas en la Tabla D, por ejemplo, con una o varias secuencias conectoras sustituidas o insertadas o con una o varias secuencias de etiquetas de purificación ancladas a estas, siempre que las variantes exhiban bioactividad/bioactividades y/o uno o varios mecanismos de activación sustancialmente similares o iguales.

Tabla D: Secuencias de aminoácidos ilustrativas de polipéptidos

SEQ ID NO	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
1000 **(AMX-500)**	ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPEAGRSASHTPAGLTGPGTSESATPESQVQLVESGGG VVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKVSDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGRTWYDFNESDYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVLSESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEVQLVESG GGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYATYYA DSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQ GTLVTVSSGTATPESGPGEAGRSASHTPAGLTGPATPESGPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESAGEPEA
1001 **(AC3092)**	ASSPAGSPTSTESGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSTPAESGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGGSAPEAGRSANHTPAGLTGPATSGSETPGTQVQLVESGGG VVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWGQGT QVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWY PNLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLLESGGG IVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTL VTVSSGTAEAASASGEAGRSANHTPAGLTGPPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT

SEQ ID NO	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	PESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTESTPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGEPEA
1002 **(AC3445)***	ASHHHHHHSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPEAGRSANHTPAGLTGPGTSESATPESQVQL VESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVAAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNES DYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSS NYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAV YYCALWYPNLWVFGGGTKLTVLSESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEVQ LLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFA HWGQGTLVTVSSGTATPESGPGEAGRSANHTPAGLTGPATPESGPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESAGEPEA
1003 **(AC3928)**	ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPEAGRSASHTPAGLTGPGTSESATPESQVQLVESGGG VVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKVSDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGRTWYDFNESDYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVLSESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEVQLLESG GGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQ GTLVTVSSGTATPESGPGEAGRSASHTPAGLTGPATPESGPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESAGEPEA
1004 **(AC3934)**	ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPEAGRSASHTPAGLTGPGTSESATPESQVQLVESGGG VVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNRKVSDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWGQG TQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWV

SEQ ID NO	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	QQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVLSESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEVQLVESGG GIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGT LVTVSSGTATPESGPGEAGRSASHTPAGLTGPATPESGPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTS ESAGEPEA
1005 **(AC2591)***	ASHHHHHHSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGGSAPEAGRSANHTPAGLTGPATSGSETPGTEVQLV ESGGGSVQAGGSLSLSCVASGRTFGIYVMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGSNRLV SDSVKGRFTISRENAKNTIYLQMNGLKPEDTANYFCAASNRLYGRTWYDFNESDY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNY ANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYY CALWYPNLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLL ESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHW GQGTLVTVSSGTAEAASASGEAGRSANHTPAGLTGPPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGAAEPEA
1006 **(AC3353)***	ASHHHHHHATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGGSAPEAGRSANHTPAGLTGPATS GSETPGTQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVA AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRT WYDFNESDYWGQGTQVTVSSGGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTS SNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVY YCALWYPNLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLLE SGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTL VTVSSGTAEAASASGEAGRSANHTPAGLTGPESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGAAEPEA
1007 **(AC3354)***	ASHHHHHHATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGGSAPEAGRSANHTPAGLTGPATS GSETPGTQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVA AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRT WYDFNESDYWGQGTQVTVSSGATPPETGAETESPGELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC RSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG

SEQ ID NO	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	VQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPP GEGEVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSW FAHWGQGTLVTVSSGTAEAASASGEAGRSANHTPAGLTGPESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGAAEPEA
1008 **(AC3356)***	ASHHHHHHATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGGSAPEAGRSANHTPAGLTGPATS GSETPGTQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVA AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRT WYDFNESDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASG FTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYL QMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSSGATPPETGAETESP GETTGGSAESEPPGEGELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLW VFGGGTKLTVLGTAEAASASGEAGRSANHTPAGLTGPESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGAAEPEA
1009 **(AC3329)***	ASHHHHHHATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGGSAPEAGRSANHTPAGLTGPRAP PEPEFARATSGSETPGTQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQ APGKEREFVAAISWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA ASNRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSA ESEPPGEGEVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSSGTAEAASASGEAGRSANHTPAGLTGPESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGAAEPEA

*La secuencia HHHHHH dentro de esta secuencia de aminoácidos es prescindible y puede eliminarse. También se divulga expresamente en el presente documento una secuencia con HHHHHH eliminada.

Producción recombinante

También se proporcionan polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido divulgado en el presente documento y/o los complementos inversos de tales polinucleótidos.

La divulgación del presente documento incluye un vector de expresión que comprende una secuencia de polinucleótidos, tal como cualquiera descrita en el párrafo anterior, y una secuencia reguladora conectada operablemente a la secuencia de polinucleótidos.

La divulgación del presente documento incluye una célula anfitriona que comprende un vector de expresión, tal como se describe en cualquiera de los

párrafos anteriores. En algunas modalidades, la célula anfitriona es un procariota. En algunas modalidades, la célula anfitriona es *E. coli*. En algunas modalidades, la célula anfitriona es una célula de mamífero.

En algunas modalidades, la divulgación proporciona métodos para elaborar las composiciones en cuestión. En algunas modalidades, tal método comprende cultivar una célula anfitriona que comprende una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido (tal como un paTCE) descrito en el presente documento en condiciones que promueven la expresión del polipéptido, seguido de la recuperación del polipéptido utilizando métodos de purificación convencionales (p. ej., cromatografía en columna, HPLC y similares) en donde se recupera la composición en la que al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %, o al menos 97 %, o al menos 99 % de los fragmentos de unión del polipéptido expresado o del polipéptido de fusión de paTCE están plegados correctamente. En algunas modalidades del método de elaboración, se recupera el polipéptido expresado en el que al menos 90 %, o al menos 95 %, o al menos 97 %, o al menos 99 % del polipéptido se recupera en forma monomérica, soluble.

En algunas modalidades, la divulgación se refiere a métodos para producir un polipéptido (tal como un polipéptido de fusión de paTCE) a altos niveles de expresión de fermentación de proteína funcional utilizando una célula anfitriona de *E. coli* o de mamífero, así como también para proporcionar vectores de expresión que codifican los polipéptidos útiles en métodos para producir composiciones de polipéptidos citotóxicamente activos a altos niveles de expresión. En algunas modalidades, el método comprende las etapas de 1) preparar un polinucleótido que codifica un polipéptido divulgado en el presente documento, 2) clonar el polinucleótido en un vector de expresión, que puede ser

un plásmido u otro vector bajo el control de secuencias de transcripción y traducción apropiadas para un alto nivel de expresión de proteínas en un sistema biológico, 3) transformar una célula anfitriona apropiada con el vector de expresión, y 4) cultivar la célula anfitriona en medios nutritivos convencionales en condiciones adecuadas para la expresión de la composición polipeptídica. Cuando se desea, la célula anfitriona es *E. coli*. Como se emplea en el presente documento, el término “plegado correctamente” significa que el componente de fragmentos de unión a antígeno de la composición tiene la capacidad de unirse específicamente a sus ligandos diana (p. ej., tras la activación). En algunas modalidades, la divulgación proporciona un método para producir un polipéptido, comprendiendo el método cultivar en una reacción de fermentación una célula anfitriona que comprende un vector que codifica un polipéptido que comprende el polipéptido en condiciones eficaces para expresar el producto polipeptídico.

Composición farmacéutica

En el presente documento se divulga una composición farmacéutica que comprende un polipéptido (tal como un paTCE), tal como cualquiera de los descritos en el presente documento, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula para administración intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraabdominal, intraperitoneal, intravítrea, intratecal o intramuscular. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula para inyección intravenosa. En algunas modalidades, la composición farmacéutica está en forma líquida o congelada. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula como un polvo liofilizado para reconstituirse antes de la administración.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar para terapia mediante cualquier vía adecuada. En algunas modalidades, la dosis se administra por vía intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraabdominal, intraperitoneal, intratecal o intramuscular. En algunas modalidades, el sujeto es un ratón, una rata, un mono o un ser humano. En modalidades preferidas, el sujeto es un ser humano.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica se puede administrar por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. En algunas modalidades, la cantidad terapéuticamente eficaz da como resultado una ganancia en el tiempo transcurrido dentro de una ventana terapéutica para la proteína de fusión en comparación con el TCE correspondiente de la proteína de fusión no conectada al ELNN y administrada a una dosis comparable a un sujeto.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa.

En algunas modalidades, la composición puede suministrarse como un polvo o una torta liofilizados para reconstituirse antes de la administración. En algunas modalidades, la composición también se puede suministrar en forma líquida o congelada, que se puede administrar directamente a un sujeto.

Kits farmacéuticos

En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona kits para facilitar el uso de paTCE. En algunas modalidades, un kit comprende (a) un primer recipiente que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un paTCE en una composición

liofilizada; y (b) un segundo recipiente que comprende un diluyente para reconstituir la formulación liofilizada. En algunas modalidades, el kit comprende adicionalmente instrucciones para el almacenamiento del kit, información sobre un cáncer que se puede tratar con el paTCE, instrucciones para la reconstitución de la formulación liofilizada y/o instrucciones de administración.

Métodos de tratamiento

En el presente documento se divulgan usos de un polipéptido, tal como cualquiera descrito en el presente documento, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un sujeto. En algunas modalidades, la enfermedad particular que se vaya a tratar dependerá de la elección de las proteínas biológicamente activas. En algunas modalidades, la enfermedad es cáncer (incluyendo cualquier forma del mismo). En el presente documento se incluyen polipéptidos paTCE para su uso en el tratamiento del cáncer. En algunos casos, el cáncer o tumor expresa PSMA. En algunas modalidades, el cáncer o tumor es un tumor sólido. En algunas modalidades, el cáncer es un carcinoma. En algunas modalidades, el carcinoma es un carcinoma gástrico. En algunas modalidades, el carcinoma es un adenocarcinoma colorrectal. En alguna modalidad, el carcinoma es un carcinoma de colon.

La presente divulgación incluye un método para tratar una enfermedad en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica, tal como cualquiera descrita en el presente documento. En algunas modalidades, la enfermedad es cáncer. En algunas modalidades, el sujeto es un ratón, una rata, un mono o un ser humano. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de próstata. En algunas modalidades, el cáncer de próstata es cáncer de próstata metastásico. En algunas modalidades, el cáncer de próstata es independiente de andrógenos. En algunas modalidades, el cáncer de próstata es cáncer de próstata resistente a la castración no metastásico (nmCRPC). En algunas modalidades, el cáncer de próstata es cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (mCRPC).

En algunas modalidades, una composición biespecífica dirigida a PSMA de la presente divulgación (tal como un paTCE) se puede combinar con inhibidores de punto de control. En algunas modalidades de tal terapia combinada, un paTCE se puede combinar con un antagonista de la proteína de muerte celular programada 1 del receptor de la superficie celular, también conocida como PD-1, y/o un antagonista de PD-L1.

PD-1 desempeña un papel importante en la regulación por disminución del sistema inmunológico y la promoción de la autotolerancia al suprimir la actividad inflamatoria de las células T. La unión de los ligandos de PD-1, PD-L1 y PD-L2 al receptor PD-1 que se encuentra en las células T inhibe la proliferación de células T y la producción de citocinas. En algunos tumores se produce una regulación por incremento de los ligandos de PD-1 y la señalización a través de esta vía puede contribuir a la inhibición de la vigilancia inmunitaria activa de las células T de los tumores. Los anticuerpos anti-PD-1 se unen al receptor PD-1 y bloquean su interacción con PD-L1 y PD-L3, liberando la inhibición de la respuesta inmunitaria mediada por la vía PD-1, incluida la respuesta inmunitaria antitumoral.

Los expertos en la técnica conocen diversos anticuerpos anti-PD-1 que se pueden utilizar. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-PD-1 ilustrativo utilizado combinado con los compuestos de la presente invención es Pembrolizumab

(Keytruda®). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 utilizado combinado con el compuesto descrito anteriormente es Nivolumab (Opdivo®). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 utilizado combinado con el compuesto descrito anteriormente es Pidilizumab (Medivation).

Otros anticuerpos contra PD-1 conocidos por los expertos en la técnica incluyen AGEN-2034 (Agenus), AMP-224 (Medimmune), BCD-100 (Biocad), BGBA-317 (Beigene), BI-754091 (Boehringer Ingelheim), CBT-501 (Genor Biopharma), CC-90006 (Celgene), cemiplimab (Regeneron Pharmaceuticals), durvalumab+MEDI-0680 (Medimmune), GLS-010 (Harbin Gloria Pharmaceuticals), IBI-308 (Eli Lilly), JNJ-3283 (Johnson & Johnson), JS-001 (Shanghai Junshi Bioscience Co.), MEDI-0680 (Medimmune), MGA-012 (MacroGenics), MGD-013 (Marcogenics), hidrocloruro de pazopanib+pembrolizumab (Novartis), PDR-001 (Novartis), PF-06801591 (Pfizer), SHR-1210 (Jiangsu Hengrui Medicine Co.), TSR-042 (Tesaro Inc.), LZM-009 (Livzon Pharmaceutical Group Inc) y ABBV-181 (AbbVie Inc.).

En algunas modalidades para la terapia combinada de la presente divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab (Keytruda®).

En algunas modalidades, las composiciones de la presente invención se combinan con un anticuerpo anti-PD-L1. Los ejemplos de tales anticuerpos anti-PD-L1 utilizados en las combinaciones de la presente invención se pueden seleccionar del grupo que consiste en Durvalumab (MedImmune LLC), Atezolizumab (Hoffmann-La Roche Ltd, Chugai Pharmaceutical Co Ltd), Avelumab (Merck KGaA), CX-072 (CytomX Therapeutics Inc), BMS-936559 (ViiV Healthcare Ltd), SHR-1316 (Jiangsu Hengrui Medicine Co Ltd), M-7824 (Merck KGaA), LY-3300054 (Eli Lilly and Co), FAZ-053 (Novartis AG), KN-035 (AlphaMab Co Ltd), CA-170 (Curis Inc), CK-301 (TG Therapeutics Inc), CS-1001 (CStone Pharmaceuticals Co Ltd), HLX-10

(Shanghai Henlius Biotech Co Ltd), MCLA-145 (Merus NV), MSB-2311 (MabSpace Biosciences (Suzhou) Co Ltd) y MEDI-4736 (Medimmune).

Otras inmunoterapias y terapias basadas en inhibidores de puntos de control que pueden ser útiles en combinación con las composiciones de la presente divulgación incluyen terapias basadas en CTLA4, TIGIT, OX40 y TIM3.

En algunas modalidades, la divulgación proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad de paTCE descrita en el presente documento al sujeto, y un inhibidor de punto de control al sujeto, en donde el cáncer comprende un tumor sólido, y el tratamiento del cáncer comprende reducir el volumen del tumor sólido.

Modalidades ilustrativas

A continuación, se proporcionan adicionalmente en el presente documento modalidades ilustrativas no limitantes:

1. Un polipéptido quimérico que comprende un dominio de anticuerpo biespecífico,

en donde el dominio de anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) y un segundo dominio de unión a antígeno que se une al receptor de células T del cúmulo de diferenciación 3 (CD3),

en donde

el primer dominio de unión a antígeno es un VHH; o

el segundo dominio de unión a antígeno es un Fab o un scFV, y

en donde el polipéptido quimérico comprende adicionalmente un polipéptido máscara unido al dominio de anticuerpo biespecífico a través de un conector que

comprende un segmento de liberación escindible por proteasa situado entre el polipéptido máscara y el dominio de anticuerpo biespecífico de manera que el polipéptido máscara es capaz de reducir la unión del dominio de anticuerpo biespecífico a CD3 o PSMA, y en donde el segmento de liberación escindible por proteasa es escindible por al menos una proteasa que está presente en un tumor.

2. Un polipéptido quimérico que comprende un dominio de anticuerpo biespecífico,

en donde el dominio de anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) y un segundo dominio de unión a antígeno que se une al receptor de células T del cúmulo de diferenciación 3 (CD3),

en donde el polipéptido quimérico comprende adicionalmente un polipéptido máscara unido al dominio de anticuerpo biespecífico a través de un conector que comprende un segmento de liberación escindible por proteasa situado entre el polipéptido máscara y el dominio de anticuerpo biespecífico de manera que el polipéptido máscara es capaz de reducir la unión del dominio de anticuerpo biespecífico a CD3 o PSMA, en donde el segmento de liberación escindible por proteasa no es susceptible de ser escindido por legumaína en plasma humano, o en donde la legumaína escinde el segmento de liberación escindible por proteasa en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 25 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) (SEQ ID NO: 7048) es escindido por legumaína.

3. El polipéptido quimérico de la modalidad 1 o 2, que comprende una configuración estructural del lado N-terminal al lado C-terminal definida como: (primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(conector)-

(polipéptido máscara), (segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(conector)-(polipéptido máscara), (polipéptido máscara)-(conector)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno), o (polipéptido máscara)-(conector)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno), en donde cada - es una conexión covalente o un conector polipeptídico.

4. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el polipéptido máscara es un polipéptido no natural de longitud extendida (ELNN).

5. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el conector comprende adicionalmente un espaciador.

6. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el segmento de liberación escindible por proteasa se fusiona al dominio de anticuerpo biespecífico a través del espaciador.

7. El polipéptido quimérico de la modalidad 5 o 6 en donde el espaciador se caracteriza porque:

(i) al menos 90 % de sus aminoácidos es glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E), prolina (P), o cualquier combinación de los mismos; y

(ii) comprende al menos 3 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

8. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 5 a 7, en donde el espaciador tiene de 9 a 14 aminoácidos de longitud.

9. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 5 a 8, en donde el espaciador comprende al menos 4 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

10. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 5 a 9, en donde los aminoácidos del espaciador consisten en A, E, G, S, P, y/o T.

11. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 5 a 10, en donde el espaciador es escindible por una proteasa que no es de mamífero.

12. El polipéptido quimérico de la modalidad 11, en donde la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

13. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 5 a 12, en donde el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla C.

14. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 5 a 13, en donde el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTSESATPES o GTATPESGPG.

15. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1 a 14, en donde el segmento de liberación escindible por proteasa comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N.

16. El polipéptido quimérico de la modalidad 15, en donde X es S.

17. El polipéptido quimérico de la modalidad 1 o 2, que comprende

un primer polipéptido máscara unido al primer dominio de unión a antígeno a través de un primer conector en donde el primer conector comprende un primer segmento de liberación (RS1) escindible por proteasa escindible por al menos una proteasa presente en un tumor; y

un segundo polipéptido máscara unido al segundo dominio de unión a antígeno a través de un segundo conector en donde el segundo conector comprende un segundo segmento de liberación (RS2) escindible por proteasa escindible por al menos una proteasa presente en un tumor.

18. El polipéptido quimérico de la modalidad 17, que comprende una configuración estructural del lado N-terminal al lado C-terminal definida como: (Máscara1)-(Conector1)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Conector2)-(Máscara2), (Máscara1)-(Conector1)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Conector2)-(Máscara2), (Máscara2)-(Conector2)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Conector1)-(Máscara1), o (Máscara2)-(Conector2)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Conector1)-(Máscara1), en donde cada – es, individualmente, un enlace covalente o un conector polipeptídico.

19. El polipéptido quimérico de la modalidad 17 o 18, en donde el primer polipéptido máscara es un primer ELNN (ELNN1) y el segundo polipéptido máscara es un segundo ELNN (ELNN2).

20. El polipéptido quimérico de la modalidad 19, que comprende una configuración estructural del lado N-terminal al lado C-terminal definida como: (ELNN1)-(Conector1)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Conector2)-(ELNN2), (ELNN1)-(Conector1)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Conector2)-(ELNN2), (ELNN2)-(Conector2)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Conector1)-(ELNN1), o (ELNN2)-(Conector2)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Conector1)-(ELNN1),

en donde cada – es, individualmente, un enlace covalente o un conector polipeptídico.

21. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 17-20, en donde Conector1 comprende adicionalmente un primer espaciador (Espaciador1).

22. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 17-21, en donde Conector2 comprende adicionalmente un segundo espaciador (Espaciador2).

23. El polipéptido quimérico de la modalidad 21 o 22, en donde RS1 se fusiona al dominio de anticuerpo biespecífico a través del Espaciador1 y/o RS2 se fusiona al dominio de anticuerpo biespecífico a través del Espaciador2.

24. El polipéptido quimérico de la modalidad 23, que comprende una configuración estructural del lado N-terminal al lado C-terminal definida como: (ELNN1)-(RS1)-(Espaciador1)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Espaciador2)-(RS2)-(ELNN2), (ELNN1)-(RS1)-(Espaciador1)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Espaciador2)-(RS2)-(ELNN2), (ELNN2)-(RS2)-(Espaciador2)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Espaciador1)-(RS1)-(ELNN1), o (ELNN2)-(RS2)-(Espaciador2)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Espaciador1)-(RS1)-(ELNN1), en donde cada - es, individualmente, un enlace covalente o un conector polipeptídico.

25. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 21-24 en donde Espaciador1 y/o el Espaciador2 se caracterizan porque:

(1) al menos 90 % de sus aminoácidos es glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E), prolina (P), o cualquier combinación de los mismos; y

(ii) comprende al menos 3 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

26. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 21-25, en donde Espaciador1 y/o el Espaciador2 tiene de 9 a 14 aminoácidos de longitud.

27. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 21-26, en donde Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden al menos 4 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

28. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 21-27, en donde los aminoácidos de Espaciador1 y/o el Espaciador2 consisten en A, E, G, S, P, y/o T.

29. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 21-28, en donde Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla C.

30. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 21-29, en donde Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTSESATPES (SEQ ID NO: 96) o GTATPESGPG (SEQ ID NO: 97).

31. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 19-30, en donde la secuencia de aminoácidos del primer ELNN tiene entre 250 aminoácidos y 350 aminoácidos de longitud, y en donde la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN tiene entre 500 aminoácidos y 600 aminoácidos de longitud.

32. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 19-31, en donde la secuencia de aminoácidos del primer ELNN tiene 294 aminoácidos de longitud, y en

donde la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN tiene 582 aminoácidos de longitud.

33. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 17-32, en donde RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N.

34. El polipéptido quimérico de la modalidad 33, en donde X es S.

35. Un polipéptido quimérico que comprende un dominio de anticuerpo biespecífico,

en donde el dominio de anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que tiene especificidad de unión a un antígeno de células cancerosas, y un segundo dominio de unión a antígeno que tiene especificidad de unión a un antígeno de células efectoras expresado sobre una célula efectora,

en donde el polipéptido quimérico comprende adicionalmente un primer ELNN unido al primer dominio de unión a antígeno a través de un primer conector que comprende un primer segmento de liberación (RS1) escindible por proteasa situado entre el primer ELNN y el primer dominio de unión a antígeno de manera que el primer ELNN es capaz de reducir la unión del primer dominio de unión a antígeno al antígeno de células cancerosas, en donde el RS1 es escindible por al menos una proteasa que está presente en un tumor,

en donde el polipéptido quimérico comprende adicionalmente un segundo ELNN unido al segundo dominio de unión a antígeno a través de un segundo conector que comprende un segundo segmento de liberación (RS2) escindible por proteasa situado entre el segundo ELNN y el segundo dominio de unión a antígeno de manera que el segundo ELNN es capaz de reducir la unión del primer

dominio de unión a antígeno al antígeno de células efectoras, en donde el RS2 es escindible por al menos una proteasa que está presente en un tumor,

en donde el primer ELNN tiene una secuencia de aminoácidos más corta que el segundo ELNN, y

en donde el antígeno de células cancerosas no es HER2.

36. El polipéptido quimérico de la modalidad 35, que comprende una configuración estructural del lado N-terminal al lado C-terminal definida como: (ELNN1)-(Conector1)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Conector2)-(ELNN2), (ELNN1)-(Conector1)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Conector2)-(ELNN2), (ELNN2)-(Conector2)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Conector1)-(ELNN1), o (ELNN2)-(Conector2)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Conector1)-(ELNN1), en donde cada – es, individualmente, un enlace covalente o un conector polipeptídico.

37. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 3-36, en donde cada - es un enlace covalente.

38. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 3-37, en donde cada - es un enlace peptídico.

39. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 36-38, en donde Conector1 comprende adicionalmente un primer espaciador (Espaciador1).

40. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 36-38, en donde Conector2 comprende adicionalmente un segundo espaciador (Espaciador2).

41. El polipéptido quimérico de la modalidad 39 o 40, en donde RS1 se fusiona al dominio de anticuerpo biespecífico a través del Espaciador1 y/o RS2 se fusiona al dominio de anticuerpo biespecífico a través del Espaciador2.

42. El polipéptido quimérico de la modalidad 41, que comprende una configuración estructural del lado N-terminal al lado C-terminal definida como: (ELNN1)-(RS1)-(Espaciador1)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Espaciador2)-(RS2)-(ELNN2), (ELNN1)-(RS1)-(Espaciador1)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Espaciador2)-(RS2)-(ELNN2), (ELNN2)-(RS2)-(Espaciador2)-(primer dominio de unión a antígeno)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Espaciador1)-(RS1)-(ELNN1), o (ELNN2)-(RS2)-(Espaciador2)-(segundo dominio de unión a antígeno)-(primer dominio de unión a antígeno)-(Espaciador1)-(RS1)-(ELNN1), en donde cada - es, individualmente, un enlace covalente o un conector polipeptídico.

43. El polipéptido quimérico de la modalidad 42, en donde cada - es un enlace covalente.

44. El polipéptido quimérico de la modalidad 42, en donde cada - es un enlace peptídico.

45. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-44, que comprende adicionalmente un conector de dominios de anticuerpo entre el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno.

46. Un polipéptido quimérico que comprende un dominio de anticuerpo biespecífico, que comprende las fórmulas que comprende del lado N-terminal al lado C-terminal:

Formula 1: (Máscara1)-(RS1)-(Espaciador1)-(primer dominio de unión a antígeno)-[conector de dominios de anticuerpo]-(segundo dominio de unión a antígeno);

Formula 2: (primer dominio de unión a antígeno)-[conector de dominios de anticuerpo]-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Espaciador2)-(RS2)-(Máscara2); o

Formula 3: (Máscara1)-(RS1)-(Espaciador1)-(primer dominio de unión a antígeno)-[conector de dominios de anticuerpo]-(segundo dominio de unión a antígeno)-(Espaciador2)-(RS2)-(Máscara2),

en donde,

el primer dominio de unión a antígeno tiene especificidad de unión a un antígeno de células cancerosas;

el segundo dominio de unión a antígeno tiene especificidad de unión a un antígeno de células efectoras expresado sobre una célula efectora;

cada - comprende, individualmente, una conexión covalente o un conector polipeptídico;

la Máscara1 es un polipéptido que es capaz de reducir la unión del primer dominio de unión a antígeno a su diana;

la Máscara2 es un polipéptido que es capaz de reducir la unión del segundo dominio de unión a antígeno a su diana;

si el polipéptido quimérico comprende la Fórmula 1, el Espaciador1 consiste en los restos A, E, G, S, P, y/o T, si el polipéptido quimérico comprende la Fórmula 2, el Espaciador2 consiste en los restos A, E, G, S, P, y/o T, y si el polipéptido quimérico comprende la Fórmula 3, el Espaciador1 y/o el Espaciador2 consisten en los restos A, E, G, S, P, y/o T; y

en donde el antígeno de células cancerosas no es HER2.

47. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 3-46, en donde cada - es, individualmente, una conexión covalente.

48. El polipéptido quimérico de la modalidad 47, en donde cada - es, individualmente, un enlace covalente.

49. El método de la modalidad 47, en donde cada - es un enlace peptídico.

50. El polipéptido quimérico de la modalidad 29, en donde cada - es, individualmente, un conector polipeptídico de no más de 5 aminoácidos.

51. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 35-50, en donde el antígeno de células cancerosas es integrina alfa-4 humana, Ang2, B7-H3, B7-H6, CEACAM5, cMET, CTLA4, FOLR1, EpCAM, CCR5, CD19, HER3, HER4, PD-L1, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), CEA, MUC1 (mucina), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16 βhCG, Lewis-Y, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM), CD133, ganglιósido GD3; 9-O-Acetil-GD3, GM2, Globo H, fucosil GM1, GD2, anhidrasa carbónica IX, CD44v6, Sonic Hedgehog (Shh), Wue-1, antígeno 1 de células plasmáticas, proteoglicano sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), CCR8, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata (STEAP), mesotelina, antígeno A33, antígeno de células madre prostáticas (PSCA), Ly-6, desmogleína 4, receptor de acetilcolina fetal (fnAChR), CD25, antígeno canceroso 19-9 (CA19-9), antígeno canceroso 125 (CA-125), receptor de la sustancia inhibidora Müelleriana tipo II (MISIIR), antígeno Tn sialilado (sTN), antígeno de activación de fibroblastos (FAP), endosialina (CD248), antígeno L6 asociado a tumores (TAL6), SAS, CD63, TAG72, antígeno de Thomsen-Friedenreich (antígeno TF), receptor I del factor de crecimiento similar a insulina (IGF-IR),

antígeno Cora, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMPs, antígeno F19, CA19-9, CA-125, alfa-fetoproteína (AFP), VEGFR1, VEGFR2, DLK1, SP17, ROR1, o EphA2.

52. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 35-51, en donde el antígeno de células cancerosas es PSMA.

53. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 35-52, en donde el antígeno de células efectoras es el cúmulo de diferenciación 3 de receptores de células T (CD3).

54. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-53, en donde el segundo dominio de unión a antígeno tiene especificidad de unión a CD3 humano y CD3 de mono cinomolgo.

55. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-54, en donde el segundo dominio de unión a antígeno tiene especificidad de unión a CD3 humano.

56. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 53-55, en donde el CD3 es CD3 épsilon, CD3 delta, CD3 gamma, o CD3 zeta.

57. El polipéptido quimérico de la modalidad 56, en donde el antígeno de células efectoras es CD3 épsilon.

58. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 46-57, en donde la Máscara1 es un primer ELNN y la Máscara2 es un segundo ELNN.

59. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 46-58, en donde el Espaciador1 y/o el Espaciador2 se caracterizan porque:

(i) al menos 90 % de sus aminoácidos es glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E), prolina (P), o cualquier combinación de los mismos; y

(ii) comprende al menos 3 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

60. El polipéptido quimérico de la modalidad 59, en donde el Espaciador1 y/o el Espaciador2 tiene de 9 a 14 aminoácidos de longitud.

61. El polipéptido quimérico de la modalidad 59 o 60, en donde el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden al menos 4 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

62. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 59-61, en donde los aminoácidos del Espaciador1 y/o el Espaciador2 consisten en A, E, G, S, P, y/o T.

63. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 59-62, en donde el Espaciador1 y/o el Espaciador2 es escindible por una proteasa que no es de mamífero.

64. El polipéptido quimérico de la modalidad 63, en donde la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

65. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 59-64, en donde el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla C.

66. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 59-65, en donde el Espaciador1 y/o el Espaciador2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTSESATPES (SEQ ID NO: 96) o GTATPESGPG (SEQ ID NO: 97).

67. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 35-66, en donde la secuencia de aminoácidos del primer ELNN es al menos 100 aminoácidos más corta que la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN.

68. El polipéptido quimérico de la modalidad 67, en donde la secuencia de aminoácidos del primer ELNN es al menos 200 aminoácidos más corta que la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN.

69. El polipéptido quimérico de la modalidad 67 o 68, en donde la secuencia de aminoácidos del primer ELNN es al menos 250 aminoácidos más corta que la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN.

70. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 35-69, en donde la secuencia de aminoácidos del primer ELNN tiene aproximadamente 294 aminoácidos de longitud, y en donde la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN tiene aproximadamente 582 aminoácidos de longitud.

71. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-70, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende un primer anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y en donde el segundo dominio de unión a antígeno es un segundo anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

72. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-71, en donde el primer dominio de unión a antígeno es un Fab, un scFV, o un ISVD.

73. El polipéptido quimérico de la modalidad 72, en donde el ISVD es un dominio VHH.

74. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-73, en donde el segundo dominio de unión a antígeno es un Fab, un scFV, o un ISVD.

75. El polipéptido quimérico de la modalidad 74, en donde el ISVD es un dominio VHH.

76. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-75, en donde el primer dominio de unión a antígeno es un dominio VHH.

77. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-76, en donde el segundo dominio de unión a antígeno es un scFV.

78. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-77, en donde hay un conector de dominios de anticuerpo entre el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno.

79. El polipéptido quimérico de la modalidad 78, en donde el conector de dominios de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla A o B.

80. El polipéptido quimérico de la modalidad 78, en donde el conector de dominios de anticuerpo consiste en restos amino G y S.

81. El polipéptido quimérico de la modalidad 78 o 79, en donde el conector de dominios de anticuerpo tiene aproximadamente 9 restos de longitud.

82. El polipéptido quimérico de la modalidad 80 o 81, en donde el conector de dominios de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 125).

83. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-82, en donde el scFv comprende un dominio VL, un dominio VH, y un conector entre el dominio VL y el dominio VH, en donde el conector consiste en los restos A, E, G, S, P, y/o T.

84. El polipéptido quimérico de la modalidad 83, en donde el conector se caracteriza porque:

(i) al menos 90 % de sus aminoácidos es glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E), prolina (P), o cualquier combinación de los mismos; y

(ii) comprende al menos 3 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

85. El polipéptido quimérico de la modalidad 83 o 84, en donde el conector entre el dominio VL y el dominio VH tiene de 25 a 35 aminoácidos de longitud.

86. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 83-85, en donde el conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende al menos 4 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

87. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 83-86, en donde los aminoácidos del conector entre el dominio VL y el dominio VH consiste en A, E, G, S, P, y/o T.

88. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 83-87, en donde el conector entre el dominio VL y el dominio VH es escindible por una proteasa que no es de mamífero.

89. El polipéptido quimérico de la modalidad 88, en donde la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

90. El polipéptido quimérico de la modalidad 89, en donde conector entre el dominio VL y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81).

91. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-90, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende un dominio VHH que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de VHH, en donde las tres CDR de VHH comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de un dominio VHH que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAM
SWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYG
RTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

92. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VL que comprende las tres CDR de VL, en donde las tres CDR de VL comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de un dominio VL que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:
ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSX_1GAVTX_2SNYANWVQQKPGQAPRGLIGG
TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAX_3YYCALWYX_4NLWVFGGG
TKLTVL, en donde X_1 corresponde a T o N, X_2 corresponde a T o S, X_3 corresponde a E o V, y X_4 corresponde a S o P.

93. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-92, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VL que comprende las tres CDR de VL, en donde las tres CDR de VL comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de un dominio VL que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:
ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT
NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTK
LTVL (SEQ ID NO: 361).

94. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VH que comprende las tres CDR de VH, en donde las tres CDR de VH comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de un dominio VH que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLX$_5$ESGGGX$_6$VQPGGSLX$_7$LSCAASGFTFX$_8$TYAMNWVRQAPGKGLEWVX$_9$RIRX$_{10}$KX$_{11}$NNYATYYADSVKX$_{12}$RFTISRDDSKNTX$_{13}$YLQMNX$_{14}$LKTEDTAVYYCVRHX$_{15}$NFGNSYVSWFAX$_{16}$WGQGTLVTVSS, en donde X$_5$ corresponde a V o L, X$_6$ corresponde a I o L, X$_7$ corresponde a R o K, X$_8$ corresponde a S o N, X$_9$ corresponde a G o A, X$_{10}$ corresponde a T o S, X$_{11}$ corresponde a R o Y, X$_{12}$ corresponde a G o D, X$_{13}$ corresponde a V o A, X$_{14}$ corresponde a S o N, X$_{15}$ corresponde a E o G, y X$_{16}$ corresponde a H o Y.

95. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VH que comprende las tres CDR de VH, en donde las tres CDR de VH comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de un dominio VH que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311).

96. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende un par de secuencia de aminoácidos de dominio VL de SEQ ID NO/secuencia de aminoácidos de dominio VH de SEQ ID NO seleccionado del grupo que consiste en: 896/897; 902/903; 700/701; 702/703; 716/717; 718/719; 728/729; 736/737; 738/739; 740/741; 742/743; 744/745; 746/747; 748/749; 750/751; 752/753; 754/755; 756/757; 758/759; 760/761; 762/763; 764/765; 766/767; 774/775; 776/777; 790/791; 792/793; 798/799; 800/801; 806/807; 808/809; 814/815; 816/817; 822/823; 824/825; o 826/867.

97. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-96, en donde

(i) el primer dominio de unión a antígeno es un VHH que comprende las siguientes CDR:

- una CDR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG;
- una CDR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRKVSDSVKG; y
- una CDR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AASNKEYGRTWYDFNESDY, y

(ii) y en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende las siguientes CDR:

- una CDR1 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RSSX$_1$GAVTX$_2$SNYAN, en donde X$_1$ corresponde a T o N, y X$_2$ corresponde a T o S;
- una CDR2 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTNKRAP;
- una CDR3 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de

identidad, o 100 % de identidad, con ALWYX$_4$NLWV, en donde X$_4$ corresponde a S o P;

- una CDR1 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GFTFX$_8$TYAMN, en donde X$_8$ corresponde a S o N;

- una CDR2 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RIRX$_{10}$KX$_{11}$NNYATYYADSVKX$_{12}$, en donde X$_{10}$ corresponde a T o S, X$_{11}$ corresponde a R o Y, y X$_{12}$ corresponde a G o D;

- una CDR3 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con HX$_{15}$NFGNSYVSWFAX$_{16}$, en donde X$_{15}$ corresponde a E o G, y X$_{16}$ corresponde a H o Y.

98. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-97, en donde

(i) el primer dominio de unión a antígeno es un VHH que comprende las siguientes CDR:

- una CDR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG;

- una CDR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRKVSDSVKG; y

- una CDR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AASNKEYGRTWYDFNESDY, y

(ii) y en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende las siguientes CDR:

- una CDR1 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RSSNGAVTSSNYAN;

- una CDR2 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTNKRAP;

- una CDR3 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ALWYPNLWV;

- una CDR1 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GFTFSTYAMN;

- una CDR2 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RIRTKRNNYATYYADSVKG; y

- una CDR3 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con HENFGNSYVSWFAH.

99. El polipéptido quimérico de la modalidad 97 o 98, en donde el VHH comprende las siguientes regiones marco (FR):

- una FR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS;
- una FR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WFRQAPGKEREFVG;
- una FR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC; y
- una FR4 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTQVTVSS.

100. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 97-99, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende las siguientes FR:

- una FR1 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC;
- una FR2 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVQQKPGQAPRGLIG;
- una FR3 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC;

- una FR4 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con FGGGTKLTVL;

- una FR1 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS;

- una FR2 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVRQAPGKGLEWVG;

- una FR3 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR; y

- una FR4 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTLVTVSS.

101. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-100, en donde

(i) el primer dominio de unión a antígeno es un VHH que comprende las siguientes CDR:

- una CDR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG;

- una CDR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRK; y

- una CDR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AASNKEYGRTWYDFNESDY, y

(ii) y en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende las siguientes CDR:

- una CDR1 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RSSX$_1$GAVTX$_2$SNYAN, en donde X$_1$ corresponde a T o N, y X$_2$ corresponde a T o S;

- una CDR2 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTNKRAP;

- una CDR3 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ALWYX$_4$NLWV, en donde X$_4$ corresponde a S o P;

- una CDR1 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GFTFX$_8$TYAMN, en donde X$_8$ corresponde a S o N;

- una CDR2 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RIRX$_{10}$KX$_{11}$NNYATYYADSVKX$_{12}$, en donde X$_{10}$ corresponde a T o S, X$_{11}$ corresponde a R o Y, y X$_{12}$ corresponde a G o D;

- una CDR3 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con $HX_{15}NFGNSYVSWFAX_{16}$, en donde X_{15} corresponde a E o G, y X_{16} corresponde a H o Y.

102. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-101, en donde

(i) el primer dominio de unión a antígeno es un VHH que comprende las siguientes CDR:

- una CDR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG;
- una CDR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRK; y
- una CDR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AASNKEYGRTWYDFNESDY, y

(ii) y en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende las siguientes CDR:

- una CDR1 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RSSNGAVTSSNYAN;
- una CDR2 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTNKRAP;

- una CDR3 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ALWYPNLWV;
- una CDR1 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GFTFSTYAMN;
- una CDR2 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RIRTKRNNYATYYADSVKG; y
- una CDR3 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con HENFGNSYVSWFAH.

103. El polipéptido quimérico de la modalidad 101 o 102, en donde el VHH comprende las siguientes regiones marco (FR):

- una FR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS;
- una FR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WFRQAPGKEREFVG;
- una FR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con VSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC; y

- una FR4 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTQVTVSS.

104. El polipéptido quimérico de la modalidad 101 o 102, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende las siguientes FR:

- una FR1 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC;
- una FR2 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVQQKPGQAPRGLIG;
- una FR3 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC;
- una FR4 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con FGGGTKLTVL;
- una FR1 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS;
- una FR2 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVRQAPGKGLEWVG;

- una FR3 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR; y
- una FR4 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTLVTVSS.

105. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:

ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSX_1GAVTX_2SNYANWVQQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAX_3YYCALWYX_4NLWV FGGGTKLTVL, en donde X_1 corresponde a T o N, X_2 corresponde a T o S, X_3 corresponde a E o V, y X_4 corresponde a S o P.

106. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:

ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFG GGTKLTVL (SEQ ID NO: 361).

107. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VH que

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:

EVQLX$_5$ESGGGX$_6$VQPGGSLX$_7$LSCAASGFTFX$_8$TYAMNWVRQAPGKGLE WVX$_9$RIRX$_{10}$KX$_{11}$NNYATYYADSVKX$_{12}$RFTISRDDSKNTX$_{13}$YLQMNX$_{14}$LKTEDTA VYYCVRHX$_{15}$NFGNSYVSWFAX$_{16}$WGQGTLVTVSS, en donde X$_5$ corresponde a V o L, X$_6$ corresponde a I o L, X$_7$ corresponde a R o K, X$_8$ corresponde a S o N, X$_9$ corresponde a G o A, X$_{10}$ corresponde a T o S, X$_{11}$ corresponde a R o Y, X$_{12}$ corresponde a G o D, X$_{13}$ corresponde a V o A, X$_{14}$ corresponde a S o N, X$_{15}$ corresponde a E o G, y X$_{16}$ corresponde a H o Y.

108. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:

EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWV GRIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHE NFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311).

109. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 83-108, en donde el dominio VL es N-terminal con respecto al dominio VH.

110. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 83-108, en donde el dominio VL es C-terminal con respecto al dominio VH.

111. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende un scFV que comprende una

secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:

ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRG
LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFG
GGTKLTVLSESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEVQLVESGGGIVQPG
GSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYATYYADSVK
GRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGT
LVTVSS.

112. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de PSMA.2, PSMA.3, PSMA.5, PSMA.6, PSMA.262, o PSMA.263.

113. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVX$_{17}$GWFRQAPGKEREFV
GAX$_{18}$SWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYX$_{19}$CX$_{20}$X$_{21}$S
NKX$_{22}$YGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS, en donde X$_{17}$, X$_{18}$, X$_{19}$, X$_{20}$, X$_{21}$, y X$_6$ corresponden cada uno, individualmente, a cualquier aminoácido de origen natural.

114. El polipéptido quimérico de la modalidad 113, en donde X$_{17}$ corresponde a M o W, X$_{18}$ corresponde a M o I, X$_{19}$ corresponde a F o Y, X$_{20}$ corresponde a A o G, X$_{21}$ corresponde a A o G, y/o X$_{22}$ corresponde a L, W, R, D, E, o G.

115. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAM SWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYG RTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

116. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-115, en donde el RS comprende un sitio de escisión por proteasa que es escindible por al menos una proteasa enumerada en la Tabla 7.

117. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-115, en donde el RS comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla 8a.

118. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-117, en donde el RS es escindible por uPA, ST14, MMP2, MMP7, MMP9, y MMP14.

119. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-118, en donde el RS no es escindible por legumaína.

120. El polipéptido quimérico de la modalidad 119, en donde el RS no es escindible por legumaína en sangre, plasma, o suero humanos.

121. El polipéptido quimérico de la modalidad 119 o 120, en donde el RS no es escindible después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas.

122. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 119-121, en donde el RS no es escindible después de la incubación con legumaína

aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas en sangre, plasma, o suero humanos.

123. El polipéptido quimérico de la modalidad 118, en donde la legumaína escinde el RS en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 50 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

124. El polipéptido quimérico de la modalidad 118, en donde la legumaína escinde el RS en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 25 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

125. El polipéptido quimérico de la modalidad 118, en donde la legumaína escinde el RS en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 10 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

126. El polipéptido quimérico de la modalidad 118, en donde la legumaína escinde el RS en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

127. El polipéptido quimérico de la modalidad 118, en donde la legumaína escinde el RS en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 2,5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

128. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 17-115, en donde el RS1 y/o RS2 comprenden escisión por proteasa que es escindible por al menos una proteasa enumerada en la Tabla 7.

129. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 17-115, en donde el RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla 8a.

130. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 17-115, en donde el RS1 y/o RS2 son escindibles por uPA, ST14, MMP2, MMP7, MMP9, y MMP14.

131. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 17-115, en donde el RS1 y/o RS2 no son escindibles por legumaína.

132. El polipéptido quimérico de la modalidad 131, en donde el RS1 y/o RS2 no son escindibles por legumaína en sangre, plasma, o suero humanos.

133. El polipéptido quimérico de la modalidad 131 o 132, en donde el RS1 y/o RS2 no son escindibles después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas.

134. El polipéptido quimérico de la modalidad 131 o 132, en donde el RS1 y/o RS2 no son escindibles después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas en sangre, plasma, o suero humanos.

135. El polipéptido quimérico de la modalidad 130, en donde la legumaína escinde el RS1 y/o RS2 en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 50 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

136. El polipéptido quimérico de la modalidad 130, en donde la legumaína escinde el RS1 y/o RS2 en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 25 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

137. El polipéptido quimérico de la modalidad 130, en donde la legumaína escinde el RS1 y/o RS2 en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 10 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

138. El polipéptido quimérico de la modalidad 130, en donde la legumaína escinde el RS1 y/o RS2 en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

139. El polipéptido quimérico de la modalidad 130, en donde la legumaína escinde el RS1 y/o RS2 en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 2,5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

140. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 17-139, en donde el RS1 comprende una secuencia de aminoácidos escindible por proteasa que comprende la secuencia: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N.

141. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 17-140, en donde el RS2 comprende una secuencia de aminoácidos escindible por proteasa que comprende la secuencia: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N.

142. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 17-141, en donde RS1 y/o RS2 comprenden una secuencia de aminoácidos escindible por proteasa que comprende la secuencia: EAGRSASHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7628).

143. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 17-142, en donde el RS1 y el RS2 son iguales.

144. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 17-142, en donde el RS1 y el RS2 son diferentes.

145. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-144, en donde el polipéptido máscara es un primer polipéptido máscara y el segmento de liberación escindible por proteasa es un primer segmento de liberación (RS1) escindible por proteasa, y en donde el polipéptido quimérico comprende adicionalmente un segundo polipéptido máscara y un segundo segmento de liberación (RS2) escindible por proteasa, en donde el segundo polipéptido máscara está unido al segundo dominio de unión a antígeno a través de un segundo segmento de liberación (RS2) escindible por proteasa situado entre el segundo polipéptido máscara y el segundo dominio de unión a antígeno de manera que el segundo polipéptido máscara reduce la unión del primer dominio de unión a antígeno a CD3, en donde el RS2 es escindible por al menos una proteasa que está presente en un tumor.

146. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-145, en donde el primer polipéptido máscara está anclado al primer dominio de unión a antígeno y en donde el segundo polipéptido máscara está anclado al segundo dominio de unión a antígeno.

147. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-146, en donde el primer polipéptido máscara es un primer ELNN y el segundo polipéptido máscara es un segundo ELNN.

148. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-147, en donde el primer ELNN y el segundo ELNN están caracterizados cada uno individualmente porque:

(i) al menos 90 % de cada uno de los aminoácidos del primer ELNN y del segundo ELNN son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E), prolina (P), o cualquier combinación de los mismos; y

(ii) cada uno comprende al menos 3 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

149. El polipéptido quimérico de la modalidad 148, en donde el primer ELNN y el segundo ELNN están caracterizados cada uno individualmente de manera adicional porque:

(i) cada uno comprende al menos 100 restos de aminoácidos;

(ii) cada uno comprende una pluralidad de motivos de secuencia no solapantes que tienen cada uno de 9 a 14 aminoácidos de longitud, en donde la pluralidad de motivos de secuencia no solapantes comprende un conjunto de motivos de secuencia no solapantes, en donde cada motivo de secuencia no solapante del conjunto de motivos de secuencia no solapantes se repite al menos dos veces en el ELNN.

150. El polipéptido quimérico de la modalidad 149, en donde la pluralidad de motivos de secuencia no solapantes comprende al menos motivo de secuencia no solapante que aparece solamente una vez dentro del ELNN.

151. El polipéptido quimérico de la modalidad 149 o 150, en donde los motivos de secuencia no solapantes comprenden uno de, o cualquier combinación, de los motivos de secuencia enumerados en la Tabla 1.

152. El polipéptido quimérico de la modalidad 149 o 150, en donde los motivos de secuencia no solapantes comprenden al menos 2, 3, o 4 de los motivos de secuencia enumerados en la Tabla 1.

153. El polipéptido quimérico de la modalidad 149 o 150, en donde los motivos de secuencia no solapantes comprenden uno cualquiera de o cualquier combinación de

GTSTEPSEGSAP, GTSESATPESGP, GSGPGTSESATP, GSEPATSGSETP, GSPAGSPTSTEE, y GTSPSATPESGP.

154. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 147-153, en donde cada uno del primer ELNN y el segundo ELNN comprende al menos 4 tipos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

155. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 147-154, en donde los aminoácidos de cada uno del primer ELNN y el segundo ELNN consiste en A, E, G, S, P, y/o T.

156. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 147-155, en donde la secuencia de aminoácidos del primer ELNN es al menos 100 aminoácidos más corta que la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN.

157. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 147-155, en donde la secuencia de aminoácidos del primer ELNN es al menos 200 aminoácidos más corta que la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN.

158. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 147-155, en donde la secuencia de aminoácidos del primer ELNN es al menos 250 aminoácidos más corta que la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN.

159. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 147-155, en donde la secuencia de aminoácidos del primer ELNN tiene aproximadamente 294 aminoácidos de longitud, y en donde la secuencia de aminoácidos del segundo ELNN tiene aproximadamente 582 aminoácidos de longitud.

160. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 147-159, en donde el primer ELNN y/o el segundo ELNN comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 3a o 3b.

161. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 147-160, en donde el primer ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:
ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATP
ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG
TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP
TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG
SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS
EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATP.

162. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 147-161, en donde el segundo ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:
ATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE
TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS
TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE
GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG
TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS
PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG
PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST
EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE
SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT
SESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP
TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAGEPEA.

163. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-162, que comprende uno o más fragmentos de códigos de barras.

164. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-163, que comprende dos o más fragmentos de códigos de barras.

165. El polipéptido quimérico de la modalidad 163 o 164, en donde cada fragmento de código de barras es diferente de cualquier otro fragmento de código de barras.

166. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 163-165, en donde cada fragmento de código de barras tiene una secuencia y peso molecular diferentes de todos los demás fragmentos que son liberables del polipéptido quimérico después de la digestión completa del polipéptido quimérico por una proteasa que no es de mamífero.

167. El polipéptido quimérico de la modalidad 166, en donde la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

168. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-167, que comprende un sitio de escisión por Glu-C que comprende una de las siguientes secuencias de aminoácidos: ATPESGPG, SGSETPGT, y GTSESATP.

169. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-168, que comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SGPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, SGPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, SGPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, SGPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, SGPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, SGPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, SGPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP,

ATPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG,

ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS,

ATPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP,

ATPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, GTSE.SATPX$_n$SGPE.SGPG,

GTSE.SATPX$_n$ATPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$GTSE.SATP,

GTSE.SATPX$_n$TTPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$STPE.SGPG,

GTSE.SATPX$_n$GTPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$GTPE.TPGS,

GTSE.SATPX$_n$SGSE.TGTP, GTSE.SATPX$_n$GTPE.GSAP,

GTSE.SATPX$_n$EPSE.SATP, TTPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG,

TTPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP,

TTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG,

TTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS,

TTPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, TTPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP,

TTPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, STPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG,

STPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP,

STPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG,

STPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS,

STPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, STPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP,

STPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, GTPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG,

GTPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP,

GTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG,

GTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS,

GTPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP,

GTPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP, GTPE.TPGSX$_n$SGPE.SGPG,

GTPE.TPGSX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$GTSE.SATP,

GTPE.TPGSX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$STPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$GTPE.TPGS, GTPE.TPGSX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.TPGSX$_n$GTPE.GSAP, GTPE.TPGSX$_n$EPSE.SATP, SGSE.TGTPX$_n$SGPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$ATPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$GTSE.SATP, SGSE.TGTPX$_n$TTPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$STPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$GTPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$GTPE.TPGS, SGSE.TGTPX$_n$SGSE.TGTP, SGSE.TGTPX$_n$GTPE.GSAP, SGSE.TGTPX$_n$EPSE.SATP, GTPE.GSAPX$_n$SGPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$GTSE.SATP, GTPE.GSAPX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$STPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$GTPE.TPGS, GTPE.GSAPX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.GSAPX$_n$GTPE.GSAP, GTPE.GSAPX$_n$EPSE.SATP, EPSE.SATPX$_n$SGPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$ATPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTSE.SATP, EPSE.SATPX$_n$TTPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$STPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTPE.TPGS, EPSE.SATPX$_n$SGSE.TGTP, EPSE.SATPX$_n$GTPE.GSAP, o EPSE.SATPX$_n$EPSE.SATP, en donde cada “.” es un sitio de escisión por Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 50.

170. El polipéptido quimérico de la modalidad 169, que comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SGPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG,

ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.GSAPX$_n$EPSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, o STPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, en donde cada "." es un sitio de escisión por Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 30.

171. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 169 o 170, en donde n es cualquier número entero de 1 a 20.

172. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 169-171, en donde n es cualquier número entero de 5 a 15.

173. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 169-172, en donde n es cualquier número entero de 3 a 7.

174. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 169-172, en donde n es cualquier número entero de 5 a 10.

175. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 169-172, en donde n es 9.

176. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 169-174, en donde n es 4.

177. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 169-176, en donde X_n es PGTGTSAT, PGSGPGT, PGTTPGTT, PGTPPTST, PGTSPSAT, PGTGSAGT, PGTGGAGT, PGTSPGAT, PGTSGSGT, PGTSSAST, PGTGAGTT, PGTGSTST, GSEPATSG, APGTSTEP, PGTAGSGT, PGTSSGGT, PGTAGPAT, PGTPGTGT, PGTGGPTT, o PGTGSGST.

178. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 169-177, en donde X_n es TGTS, SGP, TTPG, TPPT, TSPS, TGSA, TGGA, TSPG, TSGS, TSSA, TGAG, TGST, EPAT, GTST, TAGS, TSSG, TAGP, TPGT, TGGP, o TGSG.

179. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-178, en donde ni el aminoácido N-terminal ni el aminoácido C-terminal del polipéptido quimérico están incluidos en un fragmento de código de barras.

180. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-179, que comprende un ELNN con un motivo de secuencia no solapante que aparece solamente una vez dentro del ELNN, en donde el ELNN comprende adicionalmente un fragmento de código de barras que incluye al menos parte del motivo de secuencia no solapante que aparece solamente una vez dentro del ELNN.

181. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-179, que comprende un primer ELNN con un primer fragmento de código de barras y un segundo ELNN con un segundo fragmento de código de barras, en donde ni el primer fragmento de código de barras ni el segundo fragmento de código de barras incluyen un glutamato que es inmediatamente adyacente a otro glutamato, si estuviera presente, en el ELNN que contiene el fragmento de código de barras.

182. El polipéptido quimérico de la modalidad 181, en donde al menos uno de los fragmentos de códigos de barras comprende un glutamato en el extremo C-terminal del mismo.

183. El polipéptido quimérico de las modalidades 181 o 182, en donde al menos uno de los fragmentos de códigos de barras tiene un aminoácido N-terminal que está precedido inmediatamente por un glutamato en el polipéptido quimérico.

184. El polipéptido quimérico de la modalidad 181, en donde el glutamato que precede al aminoácido N-terminal del fragmento de código de barras no es inmediatamente adyacente a otro glutamato.

185. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 181-184, en donde al menos uno de los fragmentos de códigos de barras no incluye un segundo glutamato en una posición distinta del extremo C-terminal del fragmento de código de barras a menos que el segundo glutamato esté seguido inmediatamente por una prolina.

186. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-185, que comprende una sola cadena polipeptídica, en donde el polipéptido quimérico comprende un fragmento de código de barras que está en una posición dentro de la cadena polipeptídica que está a una distancia de 10 a 200 aminoácidos o de 10 a 125 aminoácidos del extremo N-terminal o del extremo C-terminal del polipéptido quimérico.

187. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 181-186, en donde el primer ELNN está en el lado N-terminal del dominio de anticuerpo biespecífico, y en donde el primer fragmento de código de barras se sitúa a una distancia de 150, 100, o 50 aminoácidos del extremo N-terminal del polipéptido quimérico.

188. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 181-187, en donde el segundo ELNN está en el lado C-terminal del dominio de anticuerpo biespecífico, y en donde el segundo fragmento de código de barras se sitúa a una distancia de 150, 100, o 50 aminoácidos del extremo C-terminal del polipéptido quimérico.

189. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 163-188, en donde al menos uno de los fragmentos de códigos de barras tiene al menos 4 aminoácidos de longitud.

190. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 163-189, en donde al menos uno de los fragmentos de códigos de barras tiene de 4 a 20, de 5 a 15, de 6 a 12, o de 7 a 10 aminoácidos de longitud.

191. El polipéptido quimérico de la modalidad 190, en donde cada polipéptido máscara comprende un fragmento de código de barras que es enumerado en la Tabla 2 o divulgado en la Tabla 3a.

192. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-191, que comprende un fragmento de código de barras que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SGPGSGPGTSE o SGPGTSPSATPE.

193. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-192, que comprende un fragmento de código de barras que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a SGPGSGPGTSE y un fragmento de código de barras que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a SGPGTSPSATPE.

194. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 163-193, en donde el fragmento de código de barras consiste en los restos A, E, G, S, P, y/o T.

195. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 163-194, en donde el fragmento de código de barras es parte de un péptido máscara.

196. El polipéptido quimérico de la modalidad 195, en donde el péptido máscara es el primer ELNN o el segundo ELNN.

197. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-196, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla D (SEQ ID NO: 1000-1009).

198. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-197, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:

ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPE
SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE
SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE
EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT
SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
SEPATSGSETPGTSESATPEAGRSASHTPAGLTGPGTSESATPESQVQLVESGGG
VVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNRKVSDS
VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGRTWYDFNESDYWG
QGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYAN
WVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC
ALWYPNLWVFGGGTKLTVLSESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEVQLVE
SGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYAT
YYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHW
GQGTLVTVSSGTATPESGPGEAGRSASHTPAGLTGPATPESGPGTSESATPESGP
GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS
EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT
STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS

ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE
SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT
SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG
SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE
GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSE
PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE
TPGTSESAGEPEA (SEQ ID NO: 1000).

199. El polipéptido quimérico de la modalidad 198, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSE
SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE
EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS
PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG
SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE
GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPEAGRSASHTPAGLTGPGTSESATPESQVQLV
ESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSNR
KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYGRTWYDFNES
DYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSS
NYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA
VYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVLSESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEV
QLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRN
NYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSW
FAHWGQGTLVTVSSGTATPESGPGEAGRSASHTPAGLTGPATPESGPGTSESAT
PESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT

STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG
SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA
PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG
SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP
ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS
TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSE
TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA
TSGSETPGTSESAGEPEA (SEQ ID NO: 1000).

200. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-199 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

201. La composición farmacéutica de la modalidad 200, que está en una forma líquida o está congelada.

202. La composición farmacéutica de la modalidad 200, que se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

203. Un dispositivo inyectable que comprende la composición farmacéutica de la modalidad 200.

204. El dispositivo inyectable de la modalidad 203, que comprende una jeringa.

205. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-204.

206. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la modalidad 205.

207. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión de la modalidad 205.

208. Un método para producir el polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-199.

209. El método de la modalidad 208, que comprende adicionalmente aislar el polipéptido quimérico de una célula anfitriona.

210. Un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz del polipéptido quimérico de una cualquiera de las modalidades 1-199 al sujeto.

211. El método de la modalidad 210, en donde el cáncer comprende un tumor sólido.

212. El método de la modalidad 210 o 211, en donde el cáncer es un carcinoma.

213. El método de una cualquiera de las modalidades 210-212, en donde el cáncer es cáncer de próstata.

214. El método de la modalidad 213, en donde el cáncer de próstata es cáncer de próstata metastásico.

215. El método de la modalidad 213, en donde el cáncer de próstata es independiente de andrógenos.

216. El método de la modalidad 213, en donde el cáncer de próstata es cáncer de próstata resistente a la castración no metastásico (nmCRPC).

217. El método de la modalidad 213, en donde el cáncer de próstata es cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (mCRPC).

218. El método de una cualquiera de las modalidades 210-217, que comprende adicionalmente administrar docetaxel al sujeto.

219. El método de una cualquiera de las modalidades 210-218, que comprende adicionalmente administrar un inhibidor de punto de control al sujeto.

220. El método de la modalidad 219, en donde el inhibidor de punto de control es un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, o un inhibidor de CTLA-4.

221. El método de la modalidad 219, en donde el inhibidor de punto de control es un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1.

222. El método de la modalidad 219, en donde el inhibidor de punto de control es pembrolizumab o cemiplimab.

223. Un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81).

224. El polipéptido conector de la modalidad 223, que es escindible por una proteasa que no es de mamífero.

225. El polipéptido conector de la modalidad 224, en donde la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

226. El polipéptido conector de una cualquiera de las modalidades 223-225, en donde el polipéptido conector conecta un primer radical polipeptídico a un segundo radical polipeptídico.

227. El polipéptido conector de una cualquiera de las modalidades 223-226, en donde el primer radical polipeptídico es un dominio VL y el segundo radical polipeptídico es un dominio VH.

228. Un polipéptido de unión a antígeno que comprende un dominio VL y un dominio VH, en donde el dominio VL se conecta al dominio VH mediante un polipéptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %,

90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81).

229. El polipéptido de unión a antígeno de la modalidad 228, en donde el polipéptido conector es escindible por una proteasa que no es de mamífero.

230. El polipéptido de unión a antígeno de la modalidad 229, en donde la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

231. El polipéptido de unión a antígeno de una cualquiera de las modalidades 228-230, que es un scFv.

232. El polipéptido de unión a antígeno de una cualquiera de las modalidades 228-231, en donde el antígeno es CD3.

233. El polipéptido de unión a antígeno de la modalidad 232, en donde el antígeno es CD3 épsilon.

234. El polipéptido conector de una cualquiera de las modalidades 223-227 o el dominio de unión a antígeno de una cualquiera de las modalidades 228-233, en donde el dominio VL es N-terminal con respecto al dominio VH.

235. El polipéptido conector de una cualquiera de las modalidades 223-227 o el dominio de unión a antígeno de una cualquiera de las modalidades 228-233, en donde el dominio VH es N-terminal con respecto al dominio VL.

236. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido conector de una cualquiera de las modalidades 223-227 o el polipéptido de unión a antígeno de una cualquiera de las modalidades 228-233, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

237. La composición farmacéutica de la modalidad 236, que está en una forma líquida o está congelada.

238. La composición farmacéutica de la modalidad 236, que se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

239. Un dispositivo inyectable que comprende la composición farmacéutica de la modalidad 236.

240. El dispositivo inyectable de la modalidad 239, que comprende una jeringa.

241. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el conector de una cualquiera de las modalidades 223-227 o el polipéptido de unión a antígeno de una cualquiera de las modalidades 228-233.

242. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la modalidad 241.

243. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión de la modalidad 242.

244. Un método para producir el conector de una cualquiera de las modalidades 223-227 o el polipéptido de unión a antígeno de una cualquiera de las modalidades 228-233.

245. El método de la modalidad 244, que comprende adicionalmente aislar el conector o el polipéptido de unión a antígeno de una célula anfitriona.

246. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos escindible por proteasa que comprende la secuencia: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N.

247. El polipéptido aislado de la modalidad 246, en donde X es S.

248. El polipéptido aislado de la modalidad 246, que no es escindible por legumaína.

249. El polipéptido aislado de la modalidad 246, que no es escindible por legumaína en sangre, plasma, o suero humanos.

250. El polipéptido aislado de la modalidad 246, que no es escindible después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas.

251. El polipéptido aislado de la modalidad 246, que no es escindible después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas en sangre, plasma, o suero humanos.

252. El polipéptido aislado de la modalidad 246, en donde la legumaína escinde el polipéptido aislado en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 50 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

253. El polipéptido aislado de la modalidad 246, en donde la legumaína escinde el polipéptido aislado en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 25 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

254. El polipéptido aislado de la modalidad 246, en donde la legumaína escinde el polipéptido aislado en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 10 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

255. El polipéptido aislado de la modalidad 246, en donde la legumaína escinde el polipéptido aislado en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

256. El polipéptido aislado de la modalidad 246, en donde la legumaína escinde el polipéptido aislado en plasma humano a una velocidad que es menor que

aproximadamente 2,5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

257. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido aislado de una cualquiera de las modalidades 246-257, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

258. La composición farmacéutica de la modalidad 257, que está en una forma líquida o está congelada.

259. La composición farmacéutica de la modalidad 257, que se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

260. Un dispositivo inyectable que comprende la composición farmacéutica de la modalidad 259.

261. El dispositivo inyectable de la modalidad 260, que comprende una jeringa.

262. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido aislado de una cualquiera de las modalidades 246-257.

263. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la modalidad 262.

264. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión de la modalidad 263.

265. Un método para producir el polipéptido aislado de una cualquiera de las modalidades 246-257.

266. El método de la modalidad 265, que comprende adicionalmente aislar el polipéptido aislado de una célula anfitriona.

267. Una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos escindible por proteasa que comprende la secuencia: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N, en donde la

secuencia de aminoácidos escindible por proteasa conecta un primer radical polipeptídico a un segundo radical polipeptídico.

268. La proteína de fusión de la modalidad 267, en donde X es S.

269. La proteína de fusión de la modalidad 267, que no es escindible por legumaína.

270. La proteína de fusión de la modalidad 267, que no es escindible por legumaína en sangre, plasma, o suero humanos.

271. La proteína de fusión de la modalidad 267, que no es escindible después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas.

272. La proteína de fusión de la modalidad 267, que no es escindible después de la incubación con legumaína aproximadamente 1 nM o menos durante aproximadamente 20 horas en sangre, plasma, o suero humanos.

273. La proteína de fusión de la modalidad 267, en donde la legumaína escinde la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 50 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

274. La proteína de fusión de la modalidad 267, en donde la legumaína escinde la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 25 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

275. La proteína de fusión de la modalidad 267, en donde la legumaína escinde la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 10 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

276. La proteína de fusión de la modalidad 267, en donde la legumaína escinde la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

277. La proteína de fusión de la modalidad 267, en donde la legumaína escinde la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa en plasma humano a una velocidad que es menor que aproximadamente 2,5 % de la velocidad a la que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP) es escindido por legumaína.

278. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 267-278, en donde el primer radical polipeptídico comprende un dominio de unión a antígeno y el segundo radical polipeptídico comprende un polipéptido de enmascaramiento.

279. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 267-278, en donde el primer radical polipeptídico comprende un dominio de unión a antígeno y el segundo radical polipeptídico es una citocina, una enzima, una hormona, un factor de crecimiento, un polipéptido quimioterapéutico, un polipéptido antiviral, o una toxina.

280. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 267-278, en donde el primer radical polipeptídico es una citocina, una enzima, una hormona, un factor de crecimiento, un polipéptido quimioterapéutico, un polipéptido antiviral, o una toxina y el segundo radical polipeptídico es un polipéptido de enmascaramiento.

281. La proteína de fusión de la modalidad 280, en donde el polipéptido de enmascaramiento comprende un ELNN.

282. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 267-281, que comprende una sola cadena polipeptídica, que comprende, en la dirección N-terminal

a C-terminal, el primer polipéptido, después la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa, después el segundo radical polipeptídico.

283. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 267-281, que comprende una sola cadena polipeptídica, que comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, el segundo polipéptido, después la secuencia de aminoácidos escindible por proteasa, después el primer radical polipeptídico.

284. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 267-283, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

285. La composición farmacéutica de la modalidad 284, que está en una forma líquida o está congelada.

286. La composición farmacéutica de la modalidad 284, que se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

287. Un dispositivo inyectable que comprende la composición farmacéutica de la modalidad 284.

288. El dispositivo inyectable de la modalidad 287, que comprende una jeringa.

289. Una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 267-283.

290. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la modalidad 289.

291. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión de la modalidad 290.

292. Un método para producir la proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 267-283.

293. El método de la modalidad 275, que comprende adicionalmente aislar la proteína de fusión de una célula anfitriona.

294. Un polipéptido ELNN que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATP
ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG
TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP
TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG
SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS
EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATP.

295. Un polipéptido ELNN que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

ATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE
TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS
TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE
GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG
TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS
PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG
PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST
EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE
SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT
SESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP
TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAGEPEA.

296. Una proteína de fusión que comprende el polipéptido ELNN de la modalidad 294 o 295.

297. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido ELNN de la modalidad 294 o 295, o la proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 267-283 y 296, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

298. La composición farmacéutica de la modalidad 297, que está en una forma líquida o está congelada.

299. La composición farmacéutica de la modalidad 297, que se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

300. Un dispositivo inyectable que comprende la composición farmacéutica de la modalidad 297.

301. El dispositivo inyectable de la modalidad 300, que comprende una jeringa.

302. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido ELNN de la modalidad 294 o 295, o la proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 267-283 y 296.

303. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la modalidad 302.

304. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión de la modalidad 303.

305. Un método para producir el polipéptido ELNN de la modalidad 294 o 295, o la proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 267-283 y 296.

306. El método de la modalidad 305, que comprende adicionalmente aislar el polipéptido ELNN o la proteína de fusión, de una célula anfitriona.

307. Un fragmento de código de barras que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SGPGTGTSATPE, SGPGSGPGTSE, SGPGTTPGTTPE, SGPGTPPTSTPE,

SGPGTSPSATPE, SGPGTGSAGTPE, SGPGTGGAGTPE, SGPGTSPGATPE, SGPGTSGSGTPE, SGPGTSSASTPE, SGPGTGAGTTPE, SGPGTGSTSTPE, TPGSEPATSGSE, GSAPGTSTEPSE, SGPGTAGSGTPE, SGPGTSSGGTPE, SGPGTAGPATPE, SGPGTPGTGTPE, SGPGTGGPTTPE, o SGPGTGSGSTPE.

308. Un fragmento de código de barras que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SGPGSGPGTSE o SGPGTSPSATPE.

309. El fragmento de código de barras de la modalidad 307 o 308, que comprende la secuencia de aminoácidos: SGPGSGPGTSE.

310. El fragmento de código de barras de la modalidad 307 o 308, que comprende la secuencia de aminoácidos: SGPGTSPSATPE.

311. Una proteína de fusión que comprende el fragmento de código de barras de una cualquiera de las modalidades 307-310.

312. Una proteína de fusión que comprende un sitio de escisión por Glu-C que comprende una de las siguientes secuencias de aminoácidos: ATPESGPG, SGSETPGT, y GTSESATP.

313. Una proteína de fusión que comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SGPE.SGPGX_nSGPE.SGPG, SGPE.SGPGX_nATPE.SGPG, SGPE.SGPGX_nGTSE.SATP, SGPE.SGPGX_nTTPE.SGPG, SGPE.SGPGX_nSTPE.SGPG, SGPE.SGPGX_nGTPE.SGPG, SGPE.SGPGX_nGTPE.TPGS, SGPE.SGPGX_nGTPE.TPGS, SGPE.SGPGX_nSGSE.TGTP, SGPE.SGPGX_nGTPE.GSAP, SGPE.SGPGX_nEPSE.SATP, ATPE.SGPGX_nSGPE.SGPG, ATPE.SGPGX_nATPE.SGPG,

ATPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG,

ATPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG,

ATPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, ATPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP,

ATPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, ATPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP,

GTSE.SATPX$_n$SGPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$ATPE.SGPG,

GTSE.SATPX$_n$GTSE.SATP, GTSE.SATPX$_n$TTPE.SGPG,

GTSE.SATPX$_n$STPE.SGPG, GTSE.SATPX$_n$GTPE.SGPG,

GTSE.SATPX$_n$GTPE.TPGS, GTSE.SATPX$_n$SGSE.TGTP,

GTSE.SATPX$_n$GTPE.GSAP, GTSE.SATPX$_n$EPSE.SATP,

TTPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG,

TTPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, TTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG,

TTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG,

TTPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, TTPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP,

TTPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, TTPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP,

STPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG,

STPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, STPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG,

STPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, STPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG,

STPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, STPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP,

STPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, STPE.SGPGX$_n$ EPSE.SATP,

GTPE.SGPGX$_n$SGPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG,

GTPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, GTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG,

GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG,

GTPE.SGPGX$_n$GTPE.TPGS, GTPE.SGPGX$_n$SGSE.TGTP,

GTPE.SGPGX$_n$GTPE.GSAP, GTPE.SGPGX$_n$EPSE.SATP,

GTPE.TPGSX$_n$SGPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$ATPE.SGPG,

GTPE.TPGSX$_n$GTSE.SATP, GTPE.TPGSX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$STPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$GTPE.TPGS, GTPE.TPGSX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.TPGSX$_n$GTPE.GSAP, GTPE.TPGSX$_n$EPSE.SATP, SGSE.TGTPX$_n$SGPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$ATPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$GTSE.SATP, SGSE.TGTPX$_n$TTPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$STPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$GTPE.SGPG, SGSE.TGTPX$_n$GTPE.TPGS, SGSE.TGTPX$_n$SGSE.TGTP, SGSE.TGTPX$_n$GTPE.GSAP, SGSE.TGTPX$_n$EPSE.SATP, GTPE.GSAPX$_n$SGPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$GTSE.SATP, GTPE.GSAPX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$STPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.GSAPX$_n$GTPE.TPGS, GTPE.GSAPX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.GSAPX$_n$GTPE.GSAP, GTPE.GSAPX$_n$EPSE.SATP, EPSE.SATPX$_n$SGPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$ATPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTSE.SATP, EPSE.SATPX$_n$TTPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$STPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTPE.SGPG, EPSE.SATPX$_n$GTPE.TPGS, EPSE.SATPX$_n$SGSE.TGTP, EPSE.SATPX$_n$GTPE.GSAP, o EPSE.SATPX$_n$EPSE.SATP, en donde cada "." es un sitio de escisión por Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 50.

314. La proteína de fusión de la modalidad 313, que comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SGPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG,

ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, GTPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, GTPE.TPGSX$_n$SGSE.TGTP, GTPE.GSAPX$_n$EPSE.SATP, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$ATPE.SGPG, ATPE.SGPGX$_n$GTPE.SGPG, TTPE.SGPGX$_n$TTPE.SGPG, o STPE.SGPGX$_n$STPE.SGPG, en donde cada "." es un sitio de escisión por Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 30.

315. La proteína de fusión de la modalidad 313 o 314, en donde n es cualquier número entero de 1 a 20.

316. La proteína de fusión de la modalidad 315, en donde n es cualquier número entero de 5 a 15.

317. La proteína de fusión de la modalidad 315, en donde n es cualquier número entero de 3 a 7.

318. La proteína de fusión de la modalidad 315, en donde n es cualquier número entero de 5 a 10.

319. La proteína de fusión de la modalidad 315, en donde n es 9.

320. La proteína de fusión de la modalidad 315, en donde n es 4.

321. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 313-320, en donde X$_n$ es PGTGTSAT, PGSGPGT, PGTTPGTT, PGTPPTST, PGTSPSAT, PGTGSAGT, PGTGGAGT, PGTSPGAT, PGTSGSGT, PGTSSAST, PGTGAGTT, PGTGSTST, GSEPATSG, APGTSTEP, PGTAGSGT, PGTSSGGT, PGTAGPAT, PGTPGTGT, PGTGGPTT, o PGTGSGST.

322. La proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 313-320, en donde X_n es TGTS, SGP, TTPG, TPPT, TSPS, TGSA, TGGA, TSPG, TSGS, TSSA, TGAG, TGST, EPAT, GTST, TAGS, TSSG, TAGP, TPGT, TGGP, o TGSG.

323. Una composición farmacéutica que comprende el fragmento de código de barras de una cualquiera de las modalidades 307-310, o la proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 311-322, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

324. La composición farmacéutica de la modalidad 323, que está en una forma líquida o está congelada.

325. La composición farmacéutica de la modalidad 323, que se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

326. Un dispositivo inyectable que comprende la composición farmacéutica de la modalidad 323.

327. El dispositivo inyectable de la modalidad 326, que comprende una jeringa.

328. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el fragmento de código de barras de una cualquiera de las modalidades 307-310, o la proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 311-322.

329. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la modalidad 328.

330. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión de la modalidad 329.

331. Un método para producir el fragmento de código de barras de una cualquiera de las modalidades 307-310, o la proteína de fusión de una cualquiera de las modalidades 311-322.

332. El método de la modalidad 331, que comprende adicionalmente aislar el fragmento de código de barras o la proteína de fusión de una célula anfitriona.

333. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PSMA, que comprenden un dominio VHH o un fragmento del mismo que comprenden tres CDR de VHH, en donde las tres CDR de VHH comprenden las CDR1, CDR2, y CDR3 de la siguiente secuencia de aminoácidos: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAM SWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYG RTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

334. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PSMA, que comprenden las siguientes CDR:

- una CDR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG;
- una CDR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRKVSDSVKG; y
- una CDR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AASNKEYGRTWYDFNESDY.

335. El anticuerpo o fragmento de la modalidad 334, que comprenden una o más de las siguientes FR:

- una FR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS;

- una FR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WFRQAPGKEREFVG;
- una FR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC; y
- una FR4 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTQVTVSS.

336. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PSMA, que comprenden las siguientes CDR:

- una CDR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GRTFGIYVWG;
- una CDR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AMSWSGSNRK; y
- una CDR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con AASNKEYGRTWYDFNESDY.

337. El anticuerpo o fragmento de la modalidad 336, que comprenden una o más de las siguientes FR:

- una FR1 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS;

- una FR2 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WFRQAPGKEREFVG;

- una FR3 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con VSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC; y

- una FR4 de VHH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTQVTVSS.

338. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PSMA, que comprenden un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAM SWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYG RTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

339. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las modalidades 333-338, que son un anticuerpo aislado o fragmento del mismo.

340. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PSMA, que comprenden un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de PSMA.2, PSMA.3, PSMA.5, PSMA.6, PSMA.262, o PSMA.263.

341. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PSMA, que comprenden un VHH que comprende una secuencia

de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVX$_{17}$GWFRQAPGKEREFV GAX$_{18}$SWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYX$_{19}$CX$_{20}$X$_{21}$S NKX$_{22}$YGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS, en donde X$_{17}$, X$_{18}$, X$_{19}$, X$_{20}$, X$_{21}$, y X$_{6}$ corresponden cada uno, individualmente, a cualquier aminoácido de origen natural.

342. El anticuerpo o fragmento de la modalidad 341, en donde X$_{17}$ corresponde a M o W, X$_{18}$ corresponde a M o I, X$_{19}$ corresponde a F o Y, X$_{20}$ corresponde a A o G, X$_{21}$ corresponde a A o G, y/o X$_{22}$ corresponde a L, W, R, D, E, o G.

343. El anticuerpo o fragmento de la modalidad 341 o 342, en donde el PSMA comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

KSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAK QIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPG YENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARY GKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNI LNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSA PPDSSWRGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVE PDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASW DAEEFGLLGSTEWAEENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHN LTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIA SGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMV FELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSAVKNFT EIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSS HNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA (SEQ ID NO: 1044).

344. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a CD3, que comprenden un dominio VL y un dominio VH, en donde:

(i) el dominio VL comprende las CDR de VL de la secuencia de aminoácidos de

ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 361); o

(ii) el dominio VH comprende las CDR de VH de la secuencia de aminoácidos de

EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311).

345. Un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprenden una o más de las siguientes CDR:

- una CDR1 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RSSNGAVTSSNYAN;
- una CDR2 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTNKRAP;
- una CDR3 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ALWYPNLWV;

- una CDR1 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GFTFSTYAMN;
- una CDR2 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RIRTKRNNYATYYADSVKG; y/o
- una CDR3 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con HENFGNSYVSWFAH.

346. El anticuerpo o fragmento de la modalidad 345, que comprende una o más de las siguientes FR:

- una FR1 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC;
- una FR2 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVQQKPGQAPRGLIG;
- una FR3 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYC;
- una FR4 de dominio VL con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con FGGGTKLTVL;

- una FR1 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS;
- una FR2 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WVRQAPGKGLEWVG;
- una FR3 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con RFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR; y/o
- una FR4 de dominio VH con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con WGQGTLVTVSS.

347. El anticuerpo o fragmento de la modalidad 345 o 346, que comprende un dominio VL.

348. El anticuerpo o fragmento de la modalidad 347, en donde el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:

ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFG GGTKLTVL (SEQ ID NO: 361).

349. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las modalidades 345-348, que comprende un dominio VH.

350. El anticuerpo o fragmento de la modalidad 349, en donde el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %,

92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:

EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWV GRIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHE NFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311).

351. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a CD3, que comprenden un dominio VL y un dominio VH, en donde el par de secuencia de aminoácidos de dominio VL de SEQ ID NO/secuencia de aminoácidos de dominio VH de SEQ ID NO se selecciona del grupo que consiste en: 896/897; 902/903; 700/701; 702/703; 716/717; 718/719; 728/729; 736/737; 738/739; 740/741; 742/743; 744/745; 746/747; 748/749; 750/751; 752/753; 754/755; 756/757; 758/759; 760/761; 762/763; 764/765; 766/767; 774/775; 776/777; 790/791; 792/793; 798/799; 800/801; 806/807; 808/809; 814/815; 816/817; 822/823; 824/825; o 826/867.

352. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las modalidades 340-351, que son un anticuerpo aislado o fragmento del mismo.

353. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las modalidades 333-352, que es un anticuerpo.

354. El anticuerpo de la modalidad 353, que es un Fab, un scFV, o un anticuerpo monoclonal.

355. El anticuerpo de la modalidad 354, que es un scFV.

356. El anticuerpo de la modalidad 355, en donde el dominio VL es N-terminal con respecto al dominio VH in el scFV.

357. El anticuerpo de la modalidad 355, en donde el dominio VL es C-terminal con respecto al dominio VH in el scFV.

358. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 353-357, en donde el scFv comprende un conector entre el dominio VL y el dominio VH, en donde el conector consiste en los restos A, E, G, S, P, y/o T.

359. El anticuerpo de la modalidad 358, en donde el conector es un ELNN.

360. El anticuerpo de la modalidad 359, en donde el ELNN es escindible por una proteasa que no es de mamífero.

361. El anticuerpo de la modalidad 360, en donde la proteasa que no es de mamífero es Glu-C.

362. El anticuerpo de la modalidad 361, en donde ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con SESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATP (SEQ ID NO: 81).

363. El anticuerpo de la modalidad 355, en donde el scFV comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con:

ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRG
LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFG
GGTKLTVLSESATPESGPGTSPGATPESGPGTSESATPEVQLVESGGGIVQPG
GSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYATYYADSVK
GRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGT
LVTVSS.

364. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las modalidades 344-364, en donde el CD3 es CD3 épsilon.

365. El anticuerpo o fragmento de la modalidad 364, en donde el CD3 épsilon comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDD KNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEM D (SEQ ID NO: 1043)

366. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las modalidades 333-365, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

367. La composición farmacéutica de la modalidad 366, que está en una forma líquida o está congelada.

368. La composición farmacéutica de la modalidad 366, que se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

369. Un dispositivo inyectable que comprende la composición farmacéutica de la modalidad 366.

370. El dispositivo inyectable de la modalidad 369, que comprende una jeringa.

371. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las modalidades 333-365.

372. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la modalidad 371.

373. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión de la modalidad 372.

374. Un método para producir el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las modalidades 333-365.

375. El método de la modalidad 374, que comprende adicionalmente aislar el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una célula anfitriona.

376. A anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de anticuerpo anti-PSMA que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una

cualquiera de las modalidades 333-343 y/o un dominio de anticuerpo anti-CD3 que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las modalidades 344-365.

377. A anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de anticuerpo anti-PSMA que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las modalidades 333-343 y un dominio de anticuerpo anti-CD3 que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las modalidades 344-365.

378. El anticuerpo multiespecífico de la modalidad 376 o 377, en donde la afinidad del dominio de anticuerpo anti-PSMA por PSMA es mayor que la afinidad del dominio de anticuerpo anti-CD3 por CD3.

379. El anticuerpo multiespecífico de una cualquiera de las modalidades 375-378, que es un anticuerpo biespecífico.

380. El anticuerpo biespecífico de la modalidad 379, que es un acoplador de células T.

381. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo multiespecífico de una cualquiera de las modalidades 375-380, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

382. La composición farmacéutica de la modalidad 381, que está en una forma líquida o está congelada.

383. La composición farmacéutica de la modalidad 381, que se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

384. Un dispositivo inyectable que comprende la composición farmacéutica de la modalidad 381.

385. El dispositivo inyectable de la modalidad 384, que comprende una jeringa.

386. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo multiespecífico de una cualquiera de las modalidades 375-380.

387. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la modalidad 386.

388. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión de la modalidad 387.

389. Un método para producir el anticuerpo multiespecífico de una cualquiera de las modalidades 375-380.

390. El método de la modalidad 389, que comprende adicionalmente aislar el anticuerpo multiespecífico de una célula anfitriona.

391. A acoplador de células T que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) y un segundo dominio de unión a antígeno que se une al receptor de células T del cúmulo de diferenciación 3 (CD3), en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende un VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREFVGAM SWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKEYG RTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549); y el segundo dominio de unión a antígeno comprende un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTK

LTVL (SEQ ID NO: 361) y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIR TKRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFG NSYVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311).

392. Una composición farmacéutica que comprende el acoplador de células T de la modalidad 391, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

393. La composición farmacéutica de la modalidad 392, que está en una forma líquida o está congelada.

394. La composición farmacéutica de la modalidad 392, que se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

395. Un dispositivo inyectable que comprende la composición farmacéutica de la modalidad 392.

396. El dispositivo inyectable de la modalidad 395, que comprende una jeringa.

397. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el acoplador de células T de la modalidad 391.

398. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la modalidad 397.

399. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión de la modalidad 398.

400. Un método para producir el acoplador de células T de la modalidad 391.

401. El método de la modalidad 400, que comprende adicionalmente aislar el acoplador de células T de una célula anfitriona.

402. Un acoplador de células T activable por proteasa (paTCE) que comprende un acoplador de células T (TCE) según la modalidad 391, en forma de una sola cadena polipeptídica, en donde el extremo N-terminal del TCE está fusionado a un primer polipéptido de enmascaramiento por un primer conector escindible por proteasa y el extremo C-terminal del TCE está fusionado a un segundo polipéptido de enmascaramiento por un segundo conector escindible por proteasa.

403. El paTCE de la modalidad 402, en donde el primer polipéptido de enmascaramiento es un primer ELNN.

404. El paTCE de la modalidad 402 o 402, en donde el segundo polipéptido de enmascaramiento es un segundo ELNN.

405. El paTCE de una cualquiera de las modalidades 402-404, en donde TCE comprende un VHH anti-PSMA que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWFRQAPGKEREF VGAMSWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAS NKEYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 549).

406. El paTCE de una cualquiera de las modalidades 402-405, en donde TCE comprende un scFv anti-CD3 que comprende un dominio VH que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWV GRIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHE NFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311) y un dominio VL que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT

NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTK LTVL (SEQ ID NO: 361).

407. Una composición farmacéutica que comprende el paTCE de una cualquiera de las modalidades 402-406, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

408. La composición farmacéutica de la modalidad 407, que está en una forma líquida o está congelada.

409. La composición farmacéutica de la modalidad 407, que se formula como un polvo o torta liofilizados que se deben reconstituir antes de su administración.

410. Un dispositivo inyectable que comprende la composición farmacéutica de la modalidad 409.

411. El dispositivo inyectable de la modalidad 410, que comprende una jeringa.

412. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el paTCE de una cualquiera de las modalidades 402-406.

413. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la modalidad 412.

414. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión de la modalidad 413.

415. Un método para producir el paTCE de una cualquiera de las modalidades 402-406.

416. El método de la modalidad 415, que comprende adicionalmente aislar el paTCE de una célula anfitriona.

417. Un polipéptido quimérico, polipéptido aislado, proteína de fusión, polipéptido de unión a antígeno, anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a un PSMA, anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del

mismo que se unen específicamente a CD3, anticuerpo multiespecífico, acoplador de células T, o paTCE, producidos mediante el método de una cualquiera de las modalidades 208, 209, 244, 245, 26, 266, 292, 293, 305, 306, 331, 332, 374, 375, 389, 390, 400, 401, 415, o 416.

418. Una secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N.

419. El polinucleótido de la modalidad 418, que es un vector.

420. El polinucleótido de la modalidad 418, que es un polinucleótido aislado.

421. Una línea celular que expresa un polipéptido exógeno que comprende la secuencia de aminoácidos: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N.

422. La línea celular de la modalidad 421, en donde el polipéptido exógeno es una proteína de fusión según una cualquiera de las modalidades 267-283.

423. La línea celular de la modalidad 421 o 422, que está en cultivo o está congelada en un recipiente de vidrio o plástico.

424. La línea celular de una cualquiera de las modalidades 421-423, que está en un biorreactor.

425. La línea celular de una cualquiera de las modalidades 421-424, que es una línea celular estable.

426. La línea celular de una cualquiera de las modalidades 421-425, que es una célula de mamífero.

427. La línea celular de la modalidad 426, que es una célula CHO o una célula HEK293.

428. La línea celular de una cualquiera de las modalidades 421-425, que es una célula procariótica.

429. La línea celular de la modalidad 428, que es una célula de *Escherichia coli*.

430. Un animal no humano que comprende un polipéptido exógeno que comprende la secuencia de aminoácidos: EAGRSAXHTPAGLTGP (SEQ ID NO: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N.

431. La secuencia de polinucleótidos de una cualquiera de las modalidades 418-420, la línea celular de una cualquiera de las modalidades 421-429, o el animal no humano de la modalidad 430, en donde X es D, E, o Q.

432. La secuencia de polinucleótidos de una cualquiera de las modalidades 418-420, la línea celular de una cualquiera de las modalidades 421-429, o el animal no humano de la modalidad 430, en donde X es G, A, V, L, I.

433. La secuencia de polinucleótidos de una cualquiera de las modalidades 418-420, la línea celular de una cualquiera de las modalidades 421-429, o el animal no humano de la modalidad 430, en donde X es P.

434. La secuencia de polinucleótidos de una cualquiera de las modalidades 418-420, la línea celular de una cualquiera de las modalidades 421-429, o el animal no humano de la modalidad 430, en donde X es F, Y, o W.

435. La secuencia de polinucleótidos de una cualquiera de las modalidades 418-420, la línea celular de una cualquiera de las modalidades 421-429, o el animal no humano de la modalidad 430, en donde X es H, K, o R.

436. La secuencia de polinucleótidos de una cualquiera de las modalidades 418-420, la línea celular de una cualquiera de las modalidades 421-429, o el animal no humano de la modalidad 430, en donde X es S, C, U, T, o M.

437. La secuencia de polinucleótidos de una cualquiera de las modalidades 418-420, la línea celular de una cualquiera de las modalidades 421-429, o el animal no humano de la modalidad 430, en donde X es S.

438. Una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-PSMA o fragmento según una cualquiera de las modalidades 333-343 y una proteína biológicamente activa.

439. Una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-CD3 o fragmento según una cualquiera de las modalidades 344-365 y una proteína biológicamente activa.

440. La proteína de fusión de la modalidad 438 o 439, en donde la proteína biológicamente activa comprende una citocina, una enzima, una hormona, un factor de crecimiento, un polipéptido quimioterapéutico, un polipéptido antiviral, o una toxina.

441. Un producto inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-PSMA o fragmento según una cualquiera de las modalidades 333-343 y un compuesto.

442. Un producto inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-CD3 o fragmento según una cualquiera de las modalidades 344-365 y un compuesto.

443. El producto inmunoconjugado de la modalidad 441 o 442, en donde el compuesto comprende un agente quimioterapéutico.

444. El producto inmunoconjugado de la modalidad 441 o 442, en donde el compuesto comprende un agente de diagnóstico.

445. El producto inmunoconjugado de la modalidad 441 o 442, en donde el compuesto comprende una toxina, una molécula radiactiva, un agente de contraste, o un fármaco.

Los siguientes son ejemplos de composiciones y evaluaciones de composiciones de la divulgación. Se entiende que se pueden poner en práctica algunas modalidades diferentes, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Incorporación como referencia

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en el presente documento como referencia en la misma medida que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual estuviera específica e individualmente indicada para ser incorporada como referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1. Producción de dominios VHH anti-PSMA de alta afinidad

Se aislaron dominios VHH de alta afinidad de llamas inmunizadas mediante escrutinio *in vitro*. Se identificaron múltiples dominios VHH que se unen a PSMA humano (hPSMA).

La secuencia de aminoácidos del antígeno hPSMA (con una secuencia HHHHHH añadida) fue la siguiente:

HHHHHHKSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQL
AKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPP
PGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIA
RYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQR
GNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMG
GSAPPDSSWRGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRG

AVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILF
ASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMY
SLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFF
QRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQ
VRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSL
FSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFY
RHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAA
AETLSEVA (SEQ ID NO: 1028)

Se identificaron múltiples clones de VHH, incluidos aquellos que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

>P01C01R3
QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTVNSYAMGWFRQAPGKEREFVASQ
SWMGAITYDADYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYRCAASRQ
ARPGLHVREYDVWGQGTQVTVSSGPGGQHHHHHH (SEQ ID NO: 1029)

>P01H01R3
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASVSSFSTNDMGWYRQAPGKQRELVAGIT
VGGNTFYAGSVKGRFTISRDNGKNTMYLQMNSLKPEDTAVYFCNVGAKYRKPE
WYSGEYWGQGTQVTVSSGPGGQHHHHHH (SEQ ID NO: 1030)

>P01G03R3
EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVVSGIAFSPYHMAWYRQAPGKQHEWVAVIT
TGGTTAYNETVEGRFSISRDNARSTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNIYGLSLKWG
QGTQVTVSSGPGGQHHHHHH (SEQ ID NO: 1031)

>P01E02R3

EVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCVANGPTFSTYAMAWFRQAPGKEHEFVAAITG
DGDTTNNADSVKGRFTISRDNAKNRVYLQLNSLKPEDTAAYYCAAGVHHTYTIP
RLWLYWGQGTQVTVSSGPGGQHHHHHH (SEQ ID NO: 1032)

>CB01A01R3

EVQLVESGGGLVQAGGSLRISCTASERSVSTYTKGWFRQAPGKERHLVAAISY
NGDTTYYSDSVKGRFTISRDNVKNTVNLQMNSLKPEDTAVYFCAARGSSWLYG
TWDDYHYWGQGTQVTVSSGPGGQHHHHHH (SEQ ID NO: 1033)

>CB01B02R3

QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCVTSGRTFDVYAMGWFRQAPGKERELVAAIN
WSGSNKFHADSVKGRFTISRDNAWKTLSLQMNSLKPEDTAVYFCAASTRLYGT
TWYEFNDSDYWGQGTQVTVSSGPGGQHHHHHH (SEQ ID NO: 1034)

>CB01H01R3

EVQLVESGGGSVQAGGSLSLSCVASGRTFGIYVMGWFRQAPGKEREFVAAIS
WSGSNRLVSDSVKGRFTISRENAKNTIYLQMNGLKPEDTANYFCAASNRLYGR
TWYDFNESDYWGQGTQVTVSSGPGGQHHHHHH (SEQ ID NO: 1035)

Ejemplo 2. Humanización de anticuerpos VHH

Antes de la humanización, se realizó un escrutinio seleccionando 7 secuencias VHH y probándolas junto con el TCE CD3.23 para escrutar su unión y función. Según este escrutinio, se seleccionaron para la humanización dos cabezas de serie principales diferentes del Ejemplo 1, PSMA.2 (también denominado en el presente documento CB01H01R3 y utilizado en un uTCE (sin la porción C-terminal GPGGQHHHHHH de la secuencia que se muestra más arriba) junto con CD3.23) y PSMA.3 (también denominado en el presente documento CB01B02R3 y utilizado en un uTCE (sin la porción C-terminal GPGGQHHHHHH de la secuencia mostrada

anteriormente) junto con CD3.23). Se espera que las secuencias humanizadas descritas en el presente documento conserven la estructura canónica de los bucles de CDR.

SEQ ID NO	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
1036	LTGPATSGSETPGTEVQLVESGGGLVQAGGSLRISCTASERSVSTYTKGWFRQAPGK ERHLVAAISYNGDTTYYSDSVKGRFTISRDNVKNTVNLQMNSLKPEDTAVYFCAARGS SWLYGTWDDYHYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPG EGEVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWF AHWGQGTLVTVSSGTAEAASASGEAGRSANHTPAG
1037	LTGPATSGSETPGTQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTVNSYAMGWFRQAPG KEREFVASQSWMGAITYDADYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYRCA ASRQARPGLHVREYDVWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESE PPGEGEVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVS WFAHWGQGTLVTVSSGTAEAASASGEAGRSANHTPAG
1038*	LTGPATSGSETPGTEVQLVESGGGSVQAGGSLSLSCVASGRTFGIYVMGWFRQAPG KEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRENAKNTIYLQMNGLKPEDTANYFCAASN RLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEP PGEGEVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVS WFAHWGQGTLVTVSSGTAEAASASGEAGRSANHTPAG
1039	LTGPATSGSETPGTQVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCVTSGRTFDVYAMGWFRQAPG KERELVAAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNAWKTLSLQMNSLKPEDTAVYFCAAST RLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEP PGEGEVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVS WFAHWGQGTLVTVSSGTAEAASASGEAGRSANHTPAG
1040	LTGPATSGSETPGTEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASVSSFSTNDMGWYRQAPG KQRELVAGITVGGNTFYAGSVKGRFTISRDNGKNTMYLQMNSLKPEDTAVYFCNVGA KYRKPEWYSGEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGE GEVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFA HWGQGTLVTVSSGTAEAASASGEAGRSANHTPAG
1041	LTGPATSGSETPGTEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCVANGPTFSTYAMAWFRQAPG KEHEFVAAITGDGDTTNNADSVKGRFTISRDNAKNRVYLQLNSLKPEDTAAYYCAAGV HHTYTIPRLWLYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS NGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEG EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAH WGQGTLVTVSSGTAEAASASGEAGRSANHTPAG

SEQ ID NO	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
1042	LTGPATSGSETPGTEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVVSGIAFSPYHMAWYRQAPGK QHEWVAVITTGGTTAYNETVEGRFSISRDNARSTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNIYGLSL KWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYA NWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLLESGG GIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTV SSGTAEAASASGEAGRSANHTPAG

* Esta es la secuencia uTCE de AC2591 (*es decir*, el TCE desenmascarado de AC2591).

Se diseñaron 27 variantes humanizadas de PSMA.2 y 31 variantes humanizadas de PSMA.3. La Tabla 9a enumera las variantes de PSMA.2 como VHH1 a VHH27. La Tabla 9b enumera las variantes de PSMA.3 como VHH1 a VHH31.

Como se muestra en la FIG. 2A-FIG. 2D, se probaron varias propiedades biofísicas de las variantes de PSMA.2. Varios clones exhibieron una unión similar o equivalente a la del clon parental (FIG. 2B; los clones con una unión más débil se muestran con puntos de color negro). Varios clones exhibieron una estabilidad térmica equivalente a 60 °C y 62 °C en comparación con el clon parental (FIG. 2C; los clones con menos estabilidad se muestran con puntos de color negro). Los uTCE de los clones AC2717 y AC2728 (*es decir*, los TCE desenmascarados de AC2717 y AC2728) sobrevivieron a 65 °C (FIG. 2E). AC2715 tuvo la mayor abundancia (FIG. 2A). En función de estas propiedades, se seleccionaron AC2728, AC2717 y AC2715 como cabezas de serie principales humanizados de la agrupación de PSMA.2.

Como se muestra en la FIG. 3A-FIG. 3C, se probaron varias propiedades biofísicas de las variantes de PSMA.3. Los uTCE de los clones AC2755 y AC2750 exhibieron una unión superior al promedio y fueron los clones térmicamente más estables.

De estas variantes humanizadas, dos (PSMA.5 (también conocida como VHH3 y utilizada en el uTCE del clon AC2717 junto con CD3.23) y PSMA.6 (también conocida como VHH14 y utilizada en el uTCE del clon AC2728 junto con CD3.23)) mostraron una afinidad de unión ligeramente reducida pero comparable y una estabilidad comparable con respecto a PSMA.2.

Para el estudio de anticuerpos biespecíficos que comprenden variantes de PSMA.2 y PSMA.3, cada variante se conectó a CD3.23 para formar el anticuerpo biespecífico.

Tabla 9a - Variantes humanizadas de PSMA 2

VHH	**Núm. de uTCE del clon que utilizó VHH junto con CD3.23**	**Secuencia**
VHH1	uTCE de AC2715	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVS AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH2	uTCE de AC2716	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVS AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH3	uTCE de AC2717	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVA AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH4	uTCE de AC2718	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVA AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTLVTVSS
VHH5	uTCE de AC2719	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVA AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEGTAVYFCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTMVTVSS
VHH6	uTCE de AC2720	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVA AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTTVTVSS
VHH7	uTCE de AC2721	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVS AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYFCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTLVTVSS
VHH8	uTCE de AC2722	EVQLVESGGGVVQPGRSLRISCAASGRTFGIYVMAWFRQAPGKEREFVA VISWSGSNKLVTDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTANYFCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTLVTVSS
VHH9	uTCE de AC2723	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMAWVRQAPGKEREFVA AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYFCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTLVTVSS
VHH10	uTCE de AC2724	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMAWVRQAPGKEREFVA AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYFCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTLVTVSS

VHH11	uTCE de AC2725	QVQLVESGGGVVQAGGSLSLSCVASGRTFGIYVMAWFRQAPGKEREFLT VISWSGSNKLVTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTGLYFCAASN RLYGRTWYDFNESDYWGQGTLLTVSS
VHH12	uTCE de AC2726	EVKLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGRTFGIYVMGWVRQVPGKSRQFVS AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRPEDTALYFCAASN RLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH13	uTCE de AC2727	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVS AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYFCAASN RLYGRTWYDFNESDYWGQGTLVTVSS
VHH14	uTCE de AC2728	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVA AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTTVTVSS
VHH15	uTCE de AC2729	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRTFGIYVMAWFRQAPGKEREFVA VISWSGSNRLVTDSVKGRFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTANYFCAASN RLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH16	uTCE de AC2730	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGIYVMGWFRQAPGKEREFVS VISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAEDTANYFCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH17	uTCE de AC2731	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGIYVMAWFRQAPGKEREFVS AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH18	uTCE de AC2732	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVS AITWSGTNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYFCAASN RLYGRTWYDFNESDYWGQGTLVTVSS
VHH19	uTCE de AC2733	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFGIYVLGWFRQAPGKEREFVS AISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYFCAGS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH20	uTCE de AC2734	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFGIYVLGWFRQAPGKEREFVS AITWSGTNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYFCAGS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH21	uTCE de AC2735	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFGIYVLGWFRQAPGKEREFVS AITWSGTNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYFCGAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH22	uTCE de AC2736	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGIYVLGWFRQAPGKEREFVSA ISYSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYFCGASNR LYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH23	uTCE de AC2737	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGIYVMGWFRQAPGKEREFVS AISWSGSDRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYFCAASN RLYGRTWYDFNESDYWGQGTLVTVSS
VHH24	uTCE de AC2738	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVRQAPGKEREFVS AITWSGTNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYFCGASN RLYGRTWYDFNESDYWGQGTLVTVSS
VHH25	uTCE de AC2739	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRTFGIYVMAWFRQAPGKEREFVA VISWSGTNRLVTDSVKGRFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTANYFCAGS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH26	uTCE of	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRTFGIYVMAWFRQAPGKEREFVA VISWSGTNRLVTDSVKGRFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTANYFCGAS NRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS
VHH27	uTCE de AC2741	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRTFGIYVMAWFRQAPGKEREFVA VITWSGTNRLVTDSVKGRFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTANYFCGASN RLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS

Tabla 9b - Variantes humanizadas de PSMA.3

VHH	**Núm. de uTCE del clon que utilizó VHH junto con CD3.23**	**Secuencia**
VHH28	uTCE de AC2742	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFDVYAMGWFRQAPGKERELV AAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH29	uTCE de AC2743	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFDVYAMGWFRQAPGKERELV SAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH30	uTCE de AC2744	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFDVYAMSWVRQAPGKERELV AAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH31	uTCE de AC2745	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGRTFDVYAMGWVRQAPGKERELV SAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH32	uTCE de AC2746	QVQLEESGGGVVQPGRSLRLSCVVSGRTFDVYAMGWVRQAPGKERELV AAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRPEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH33	uTCE de AC2747	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFDVYAMAWFRQAPGKERELV AAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRPEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH34	uTCE de AC2748	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFDVYAMGWFRQAPGKEREL VAAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYFCA ASTRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH35	uTCE de AC2749	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFDVYAMGWFRQAPGKERELV AAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH36	uTCE de AC2750	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFDVYAMGWFRQAPGKGREL VAAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYFCA ASTRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH37	uTCE de AC2751	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFDVYAMGWFRQAPGKERELV AAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKKTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH38	uTCE de AC2752	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFDVYAMGWFRQAPGKGRELV SAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH39	uTCE de AC2753	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFDVYAMGWFRQAPGKERELV AAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRADDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH40	uTCE de AC2754	QVQVIESGGGVVQSGKSLRLACTTSGRTFDVYAMGWFRQAPGKGRELV AAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH41	uTCE de AC2755	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFDVYAMGWVRQAPGKERELV AAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKTEDTAMYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH42	uTCE de AC2756	EVQLLESGGGLVQSGDSLRLSCATSGRTFDVYAMSWFRQAPGKERELV SAIDWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSWKTLYLQMNSLRPEDTAVYFCA ASTRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS

VHH43	uTCE de AC2757	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCATSGFTFDVYAMGWFRQAPGKERELV SAINWGGSNKFHADSVKGRFTISRDNAWKTLYLQMNSLRAEDTAVYFCA ASTRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH44	uTCE de AC2758	QVQLVESGGGVVQPGDSLRLSCATSGRTFDVYAMGWFRQAPGKERELV AAINWAGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH45	uTCE de AC2759	QVQLVESGGGVVQPGDSLRLSCATSGRTFDVYAMSWFRQAPGKERELV AAINWAGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRPEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH46	uTCE de AC2760	QVQLVESGGGVVQPGDSLRLSCATSGRTFDVYAMAWFRQAPGKERELV AAINWAGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRPEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH47	uTCE de AC2761	QVQLVESGGGVVQPGDSLRLSCATSGRTFDVYAMAWFRQAPGKERELV AAINWGGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRPEDTAVYFCAA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH48	uTCE de AC2762	EVQLLESGGGLVQSGDSLRLSCATSGRTFDVYAMSWFRQAPGKERELV SAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSWKTLYLQMNSLRPEDTAVYFCG ATSRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH49	uTCE de AC2763	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCATSGFTFDVYAMGWFRQAPGKERELV SAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNAWKTLYLQMNSLRAEDTAVYFCA GSTRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH50	uTCE de AC2764	QVQLVESGGGVVQPGDSLRLSCATSGRTFDVYAMGWFRQAPGKERELV AAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYFCGA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH51	uTCE de AC2765	QVQLVESGGGVVQPGDSLRLSCATSGRTFDVYAMSWFRQAPGKERELV AAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRPEDTAVYFCAG TSRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH52	uTCE de AC2766	QVQLVESGGGVVQPGDSLRLSCATSGRTFDVYAMAWFRQAPGKERELV AAINWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRPEDTAVYFCAG TTRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH53	uTCE de AC2767	EVQLLESGGGLVQSGDSLRLSCATSGRTFDVYAMSWFRQAPGKERELV SAIDWSGSNKFHADSVKGRFTISRDNSWKTLYLQMNSLRPEDTAVYFCG ATSRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH54	uTCE de AC2768	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCATSGFTFDVYAMGWFRQAPGKERELV SAINWGGSNKFHADSVKGRFTISRDNAWKTLYLQMNSLRAEDTAVYFCA GSTRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH55	uTCE de AC2769	QVQLVESGGGVVQPGDSLRLSCATSGRTFDVYAMGWFRQAPGKERELV AAINWAGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYFCGA STRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH56	uTCE de AC2770	QVQLVESGGGVVQPGDSLRLSCATSGRTFDVYAMSWFRQAPGKERELV AAINWAGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRPEDTAVYFCAG TSRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH57	uTCE de AC2771	QVQLVESGGGVVQPGDSLRLSCATSGRTFDVYAMAWFRQAPGKERELV AAINWAGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRPEDTAVYFCAG TTRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS
VHH58	uTCE de AC2772	QVQLVESGGGVVQPGDSLRLSCATSGRTFDVYALAWFRQAPGKERELV AAINWGGSNKFHADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRPEDTAVYFCA GTSRLYGTTWYEFNDSDYWGQGTQVTVSS

Ejemplo 3. Eliminación de supuestos epítopos de células T

Se utilizó PSMA.5 como molde para la eliminación de PTE basándose en un programa de predicción informático patentado. Se identificaron tres posibles puntos calientes en PSMA.5 que fueron marcados como Pep19, Pep26 y Pep33. Se realizó una ronda de escrutinio generando 102 mutaciones puntuales (Agrupación 1). Se escrutaron las mutaciones de la Agrupación 1 para determinar su unión y estabilidad térmica. Se generó una agrupación (Agrupación 2) de mutaciones combinadas a partir de la Agrupación 1 y comprendía 40 clones. Cada clon de la Agrupación 2 tenía más de 2 mutaciones. Se escrutó la Agrupación 2 para determinar su unión y estabilidad térmica. Se seleccionó PSMA.263 de la Agrupación 2 como molde y se combinó con mutaciones adicionales de la Agrupación 1 para formar la Agrupación 3. Se probaron un total de 60 variantes de la Agrupación 3. Se seleccionó PSMA.350 de la Agrupación 3 como cabeza de serie final de VHH en AMX-500. La FIG. 4 representa puntuaciones de PTE de variantes de PSMA y variantes de CD3 representativas. El gráfico muestra moléculas con Anticuerpo Antifármaco (ADA) conocido y su puntuación de PTE correspondiente. La puntuación más alta indica una mayor probabilidad de tener supuestos epítopos de células T.

Se probó adicionalmente PSMA.350 para determinar la inmunogenicidad de las células T en un ensayo de inmunogenicidad EpiScreen™ DC: T Cell. Brevemente, se extrajeron PBMC de 20 donantes sanos. Se aislaron células dendríticas derivadas de monocitos y células T CD4+. El Día 4 del cultivo, se añadió el antígeno de prueba al cultivo. El neoantígeno hemocianina de lapa californiana (KLH) se utilizó como control positivo en un cultivo separado. Las células T CD4+

se aislaron el Día 5. La proliferación de células T se controló los Días 9, 10, 11 y 12. Como se muestra en la FIG. 5, PSMA.350 indujo respuestas positivas de los donantes en solo 5 % de las muestras de donantes, mientras que el control positivo KLH indujo una respuesta positiva en 95 % de las muestras.

Las Tablas 10, 10b y 10c proporcionan las secuencias de unión de PSMA para las Agrupaciones 1, 2 y 3, respectivamente. Las tablas también proporcionan los números de clones de TCE en los que se utilizaron las secuencias de unión de PSMA junto con CD3.23.

Tabla 10a – Secuencias de VHH contra PSMA de la agrupación 1

Mutación	**Dominio PSMA**	**Secuencia**	**Núm. del clon que utilizó VHH junto con CD3.23**
Ninguna	PSMA.5	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVFGWVRQAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS	AC2717
Y32A	PSMA.41	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWARQAPGKEREFVAAISWTGSNRYVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRTYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS	AC3251
Y32K	PSMA.42	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIKVMGWVRQAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS	AC3252
V33A	PSMA.43	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYAMGWVRQAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS	AC3253
V33H	PSMA.44	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYHMGWVRQAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS	AC3254
V33P	PSMA.45	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYPMGWVRQAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS	AC3255
V33S	PSMA.46	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWARQAPGKEREFVAAISWTGSNRYVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRTYGRTWYDFNESDYWGQGTQVTVSS	AC3256
V33W	PSMA.47	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYWMGWVRQAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT	AC3257

		LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	
V33Y	PSMA.48	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYYMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3258
M34F	PSMA.49	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVFGWVRQ APGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3259
M34W	PSMA.50	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVWGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3260
V37A	PSMA.51	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWAR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3261
V37I	PSMA.52	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWIRQ APGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3262
V37F	PSMA.53	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWFR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3263
V37P	PSMA.54	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWPR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3264
V37Y	PSMA.55	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWYR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3265
R38Q	PSMA.56	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVQ QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3266
R38K	PSMA.57	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVK QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3267
R38S	PSMA.58	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVS QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3268
F47L	PSMA.59	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKERELVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3269
F47W	PSMA.60	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREWVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3270
F47Y	PSMA.61	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREYVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT	AC3271

		LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	
V48W	PSMA.62	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFWAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3272
A49G	PSMA.63	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVGAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3273
I51A	PSMA.64	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAASWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3274
I51R	PSMA.65	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAARSWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3275
I51E	PSMA.66	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAESWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3276
I51Q	PSMA.67	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAQSWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3277
I51G	PSMA.68	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAGSWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3278
I51H	PSMA.69	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAHSWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3279
I51M	PSMA.70	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAMSWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3280
I51P	PSMA.71	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAPSWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3281
I51S	PSMA.72	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAASSWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3282
I51W	PSMA.73	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAWSWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3283
I51V	PSMA.74	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAVSWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3284
S52A	PSMA.75	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAIAWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT	AC3285

		LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	
S52D	PSMA.76	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAIDWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3286
S52E	PSMA.77	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAIEWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3287
S52G	PSMA.78	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAWSWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3288
S52H	PSMA.79	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAIHWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3289
S52P	PSMA.80	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAIPWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3290
S52T	PSMA.81	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAITWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3291
S52W	PSMA.82	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAIWWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3292
S52Y	PSMA.83	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAIYWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3293
W53V	PSMA.84	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3294
S54A	PSMA.85	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3295
S54D	PSMA.86	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3296
S54E	PSMA.87	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3297
S54Q	PSMA.88	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3298
S54G	PSMA.89	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT	AC3299

		LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	
S54K	PSMA.90	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3300
S54P	PSMA.91	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3301
S54W	PSMA.92	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWWGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3302
G55D	PSMA.93	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3303
S56A	PSMA.94	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3304
S56N	PSMA.95	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3305
S56E	PSMA.96	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3306
S56Q	PSMA.97	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3307
S56G	PSMA.98	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3308
S56H	PSMA.99	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3309
S56L	PSMA.100	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGLNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3310
S56P	PSMA.101	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGPNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3311
S56T	PSMA.102	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGTNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3312
N57D	PSMA.103	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSDRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT	AC3313

		LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	
N57Q	PSMA.104	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSQRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3314
N57G	PSMA.105	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSGRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3315
N57H	PSMA.106	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSHRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3316
N57F	PSMA.107	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSFRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3317
N57P	PSMA.108	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSPRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3318
R58A	PSMA.109	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNALVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3319
R58Q	PSMA.110	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNQLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3320
R58I	PSMA.111	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNILVSDSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3321
R58T	PSMA.112	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNTLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3322
L59A	PSMA.113	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRAVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3323
L59N	PSMA.114	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRNVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3324
L59E	PSMA.115	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNREVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3325
L59Q	PSMA.116	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRQVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3326
L59G	PSMA.117	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRGVSDSVKGRFTISRDNSKNT	AC3327

		LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	
L59H	PSMA.118	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRHVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3328
L59K	PSMA.119	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRKVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3329
L59M	PSMA.120	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRMVSDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3330
L59P	PSMA.121	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRPVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3331
L59S	PSMA.122	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRSVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3332
L59T	PSMA.123	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRTVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3333
L59Y	PSMA.124	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRYVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3334
V60Y	PSMA.125	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLYSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3335
R67Q	PSMA.126	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGQFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3336
S99E	PSMA.127	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAAENRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3337
S99Q	PSMA.128	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3338
S99H	PSMA.129	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAAYNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3339
S99Y	PSMA.130	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3340
N100E	PSMA.131	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT	AC3341

		LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASERLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	
R101K	PSMA.132	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3342
L102A	PSMA.133	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRAYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3343
L102Q	PSMA.134	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRQYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3344
L102H	PSMA.135	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRHYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3345
L102K	PSMA.136	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRKYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3346
L102M	PSMA.137	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRMYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3347
L102F	PSMA.138	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRFYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3348
L102P	PSMA.139	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRPYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3349
L102T	PSMA.140	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRTYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3350
L102W	PSMA.141	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRWYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3351
L102Y	PSMA.142	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTFGIYVMGWVR QAPGKEREFVAAISWSGSNRLVSDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3352

Tabla 10b – Secuencias de VHH contra PSMA de la agrupación 2

Dominio PSMA	**Unión a huPSMA K_D (nM)**	**Puntuación de PTE**	**Secuencia**	**Número AC**

PSMA.5	4,8	69	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC2717
PSMA.119	4,1	46	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWVRQAPGKEREFVAAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3329
PSMA.250	6,2	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWYRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3461
PSMA.251	5,1	27	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWYRQAPGKEREFVAAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3462
PSMA.252	15,9	15	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWYRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRWYGRTWYDFNESDY WGQGTQVTVSS	AC3463
PSMA.253	8,5	16	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWYRQAPGKEREFVAAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRWYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3464
PSMA.254	41,0	15	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWYRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3465
PSMA.255	18,9	16	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWYRQAPGKEREFVAAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRYYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3466
PSMA.256	3,4	29	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWYRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3467
PSMA.257	2,3	30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWYRQAPGKEREFVAAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3468
PSMA.260	11,4	23	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYAMGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3469
PSMA.261	2,1	23	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVFGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	AC3470

			EDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	
PSMA.262	2,7	23	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3471
PSMA.263	No determinada	23	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3472
PSMA.264	18,6	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYAMGWVRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3473
PSMA.265	3,9	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVFGWVRQAPGKEREFVAAMSWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3474
PSMA.266	4,6	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWVRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3475
PSMA.267	5,6	20	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3476
PSMA.268	131,3	20	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYAMGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRTYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3477
PSMA.269	5,5	20	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVFGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRTYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3478
PSMA.270	6,5	20	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRTYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3479
PSMA.271	9,1	23	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRTYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3480
PSMA.272	503,7	23	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYAMGWVRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRTYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3481

PSMA.273	16,6	23	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVFGWVRQAPGKEREFVAAMSWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRTYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3482
PSMA.274	39,6	23	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWVRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRTYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3483
PSMA.275	20,5	24	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRTYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3484
PSMA.276	10,5	24	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYAMGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRMYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3485
PSMA.277	3,1	24	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVFGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRMYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3486
PSMA.278	3,9	24	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRMYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3487
PSMA.279	2,3	27	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRMYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3488
PSMA.280	16,3	27	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYAMGWVRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRMYGRTWYDFNESDY WGQGTQVTVSS	AC3489
PSMA.281	5,3	27	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVFGWVRQAPGKEREFVAAMSWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRMYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3490
PSMA.282	8,7	27	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWVRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRMYGRTWYDFNESDY WGQGTQVTVSS	AC3491
PSMA.283	3,5	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRMYGRTWYDFNESDY WGQGTQVTVSS	AC3492
PSMA.284	4,1	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYAMGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	AC3493

			EDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	
PSMA.285	3,1	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVFGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3494
PSMA.286	Sin unión	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWVRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3495
PSMA.287	2,3	29	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3496
PSMA.288	6,0	29	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYAMGWVRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3497
PSMA.289	6,2		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVFGWVRQAPGKEREFVAAMSWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3498
PSMA.290	5,5	29	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWVRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3499
PSMA.291	2,6	29	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVAAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNRLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3500

Tabla 10c – Secuencias de VHH contra PSMA de la agrupación 3

Dominio PSMA	**Unión a huPSMA KD (nM)**	**Puntuación de PTE**	**Secuencia**	**Número AC**	**SEQ ID NO**
PSMA.301	10,0	23	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3703	500
PSMA.302	2,8	16	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3704	501

PSMA.303	10,3	18	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYFCAASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3705	502
PSMA.304	5,9	11	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYFCAASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3706	503
PSMA.305	N/D (tiene unión fuerte)	16	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3707	504
PSMA.306	10,4	18	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3708	505
PSMA.307	6,0	11	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3709	506
PSMA.308	8,8	0	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNKWYGRTWYDFNESDY WGQGTQVTVSS	AC3710	507
PSMA.309	8,5	0	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYFCAASNKWYGRTWYDFNESDY WGQGTQVTVSS	AC3711	508
PSMA.310	23,1	12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCGGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3712	509
PSMA.311	Sin Unión	12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVDYCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3713	510
PSMA.312	12,0	13	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCGASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3714	511
PSMA.313	Sin Unión	12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNKRYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3715	512
PSMA.314	69,9	12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	AC3716	513

			EDTAVYYCAASNKDYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS		
PSMA.315	24,2	12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNKEYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3717	514
PSMA.316	150,0	13	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAASNKGYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3718	515
PSMA.317	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVAYCAGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3719	516
PSMA.318	Sin Unión	16	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVRYCAGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3720	517
PSMA.319	Sin Unión	16	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVNYCAGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3721	518
PSMA.320	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVGYCAGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3722	519
PSMA.321	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVKYCAGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3723	520
PSMA.322	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVSYCAGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3724	521
PSMA.323	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVTYCAGSNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3725	522
PSMA.324	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVAFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3726	523
PSMA.325	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVRFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3727	524

PSMA.326	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVNFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3728	525
PSMA.327	Sin Unión	12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVDFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3729	526
PSMA.328	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVGFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3730	527
PSMA.329	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVKFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3731	528
PSMA.330	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVSFCAASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3732	529
PSMA.331	12,1	14	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYFCGASNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3733	530
PSMA.332	24,1	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYFCAGSNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3734	531
PSMA.333	Sin Unión	14	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYFCAASNKRYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3735	532
PSMA.334	70,6	12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYFCAASNKDYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3736	533
PSMA.335	24,8	12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYFCAASNKEYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3737	534
PSMA.336	129,1	14	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYFCAASNKGYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3738	535
PSMA.337	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	AC3739	536

			EDTAVAFCAGSNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS		
PSMA.338	Sin Unión	16	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVRFCAGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3740	537
PSMA.339	Sin Unión	16	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVNFCAGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3741	538
PSMA.340	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVGFCAGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3742	539
PSMA.341	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVKFCAGSNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3743	540
PSMA.342	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVSFCAGSNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3744	541
PSMA.343	Sin Unión	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVTFCAGSNKLYGRTWYDFNESDYWG QGTQVTVSS	AC3745	542
PSMA.344	No determinada	12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVMGWFRQAPGKEREFVGAISWSGSNR KVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYFCGGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	Ninguno	543
PSMA.345	6,1	0	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCGGSNKLYGRTWYDFNESDY WGQGTQVTVSS	AC3747	544
PSMA.346	Sin Unión	0	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVDYCAASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3748	545
PSMA.347	7,3	1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCGASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3749	546
PSMA.348	1149,0	0	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNKRYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3750	547

PSMA.349	18,0	0	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNKDYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3751	548
PSMA.350	7,4	0	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNKEYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3752	549
PSMA.351	32,6	1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAASNKGYGRTWYDFNESDY WGQGTQVTVSS	AC3753	550
PSMA.352	Sin Unión	0	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVDFCAASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3754	551
PSMA.353	5,1	2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYFCGASNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3755	552
PSMA.354	1089,0	2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYFCAASNKRYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3756	553
PSMA.355	17,8	0	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYFCAASNKDYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3757	554
PSMA.356	7,8	0	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYFCAASNKEYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3758	555
PSMA.357	24,6	2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYFCAASNKGYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3759	556
PSMA.358	6,5	0	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYFCGGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3760	557
PSMA.359	Sin Unión	4	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVRYCAGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS	AC3761	558
PSMA.360	Sin Unión	4	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGRTF GIYVWGWFRQAPGKEREFVGAMSWSGSN RKVSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR	AC3762	559

			AEDTAVNYCAGSNKLYGRTWYDFNESDYW GQGTQVTVSS		

Ejemplo 4. Análisis de unión a PSMA

Se determinó la cinética de unión a PSMA para clones seleccionados de anticuerpos no humanizados contra PSMA humano. Los valores de afinidad de unión se representan a continuación en la Tabla 11. Cada anticuerpo contra PSMA se emparejó con el anticuerpo contra CD3 CD3.23.

Tabla 11: Afinidad de unión para anticuerpos contra PSMA seleccionados

SEQ ID NO	Descripción	K_D (nM)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
1036	PSMA-VHH; CB01A01R3, CD3.23	12,87	9,87E+04	1,27E-03
1037	PSMA-VHH; P01C01R3, CD3.23	Unión débil		
1038	PSMA-VHH; CB01H01R3, CD3.23	0,79	1,10E+05	8,70E-05
1039	PSMA-VHH; CB01B02R3, CD3.23	1,15	1,78E+05	2,05E-04
1040	PSMA-VHH; P01H01R3, CD3.23	Sin unión		
1041	PSMA-VHH; P01E02R3, CD3.23	0,60	2,61E+05	1,56E-04
1042	PSMA-VHH; P01G03R3, CD3.23	55,74	9,67E+03	5,39E-04

Los uTCE que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 1038 (el TCE desenmascarado, o uTCE, de AC2591), 1039 y 1041 tenían una afinidad nM de menos de un solo dígito.

A continuación, se realizaron ensayos de competición de epítopos. Se cargó un biosensor Octet AHC con PSMA-Fc humano, seguido del uTCE de AC2591. A continuación, el complejo de PSMA-Fc humano y el uTCE de AC2591 se sumergieron en uTCE que tenían las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 1036, 1039 y 1041. Los resultados del ensayo de competición indicaron que los

uTCE que tenían las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 1036, 1038 (el uTCE de AC2591) y 1039 tienen un epítopo solapante, mientras que el uTCE que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 1042 se une a un epítopo diferente al uTCE de AC2591.

Se determinaron las afinidades de unión y las temperaturas de fusión para PSMA.5 y otras variantes. Como se muestra en la Tabla 12 a continuación, los clones con eliminación de PTE para PSMA poseen afinidades de unión más cercanas a PSMA.2. Todos los clones de eliminación de PTE se combinaron con CD3.23. Todos los clones se escrutaron como paTCE desenmascarado (uTCE).

Tabla 12 – Afinidades de unión y temperaturas de fusión de anticuerpos contra PSMA seleccionados

uTCE	**Extremo N**	**Longitud del N_ELNN (número de restos)**	**RS**	**aPSMA**	**Longitud del Conector (número de restos)**	**aCD3**		**RS**	**Longitud del C_ELNN (número de restos)**	**K_D PSMA, Octet, (nM)**	**TM**
				Dominio		**Dominio**	**Orden**				
uTCE de AC2591	ASHHHHHH	288	2295	PSMA.2	9	CD3.23	VL-VH	2295	576	1±0,6	64,3
uTCE de AC3092		288	2295	PSMA.5	9	CD3.23	VL-VH	2295	576	3,9± 1,8	64,6
uTCE de AC3354	ASHHHHHH	144	2295	PSMA.5	15	CD3.23	VL-VH	2295	144	3,5± 0,07	64,74
uTCE de AC3353	ASHHHHHH	144	2295	PSMA.5	5	CD3.23	VL-VH	2295	144	2,1± 0,2	64,05
uTCE de AC3356	ASHHHHHH	144	2295	PSMA.5	9	CD3.23	VH-VL	2295	144	2,4± 0,1	63,71
uTCE de AC3342	ASHHHHHH	144	2295	PSMA.132	9	CD3.23	VL-VH	2295	144	5,6± 1,8	63,51
uTCE de AC3329	ASHHHHHH	144	2295	PSMA.119	9	CD3.23	VL-VH	2295	144	3,2± 1,8	64,45

uTCE de AC3185	ASHHHHHH	144	2295	PSMA.37	5	CD3.23	VL-VH	2295	144	1,1± 0,1	**62,57**
uTCE de AC3265	ASHHHHHH	144	2295	PSMA.55	9	CD3.23	VL-VH	2295	144	2,7± 0,9	64,45

Octet probó la afinidad de unión de variantes seleccionadas de PTE para PSMA. Se utilizaron fusiones de PSMA-Fc humano y se midieron con PSMA-uTCE 300 nM, 100 nM, 33 nM y 3,6 nM. PSMA.55, PSMA.119 y PSMA.132 son mutantes de un solo punto de variantes de eliminación de PTE que muestran unión y estabilidad mantenidas. PSMA.2 es un VHH de camélido. PSMA.5 y PSMA.6 son VHH humanizados de PSMA. Se determinó que la mutación Y a F en PSMA.6 elimina PTE en un ensayo. Las afinidades de unión se muestran a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13 – Afinidades de unión de anticuerpos contra PSMA seleccionados

Molécula	K_D (nM)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)
PSMA.55	2,7±0,9	1,04E+05	2,80E-04
PSMA.119	3,2±1,8	8,00E+04	2,48E-04
PSMA.132	5,6±1,8	8,66E+04	4,79E-04
PSMA.2	1±0,6	1,25E+05	1,22E-04
PSMA.5	3,9±1,8	7,25E+04	2,73E-04
PSMA.6	2,3±1	9,63E+04	2,35E-04

La afinidad de unión de los anticuerpos contra PSMA se probó en el formato de paTCE utilizando diferentes longitudes de conector entre el anticuerpo contra PSMA y el anticuerpo contra CD3 para determinar el efecto de la longitud del conector sobre la afinidad de unión. Se probó un conector de 5 aminoácidos (pentámero) y 15 aminoácidos (pentadecámero). También se probó un CD3 con intercambio de dominio (orientación VH-VL y orientación VL-VH desde el extremo

N-terminal al extremo C-terminal). Los resultados, que se muestran a continuación en la Tabla 14, muestran que la longitud del conector y el intercambio de dominio no afectaron a la unión. PSMA.37 también tuvo una afinidad de unión similar a PSMA.2.

Tabla 14: Afinidades de unión de anticuerpos contra PSMA seleccionados con longitudes de conector alternativas e intercambio de dominio para CD3

Molécula	K_D (nM)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)
PSMA.5 (pentámero)	2,1±0,2	1,1E+05	2,2E-04
PSMA.5 (pentadecámero)	3,5±0,07	7,7E+04	2,7E-04
PSMA.5 (intercambio de dominio)	2,4±0,1	7,6E+04	1,8E-04
PSMA.37 (scFv)	1,1±0,1	1,2E+05	1,4E-04
PSMA.2	1±0,6	1,2E+05	1,2E-04
PSMA.5	3,9±1,8	7,2E+04	2,7E-04
PSMA.6	2,3±1	9,6E+04	2,4E-04

Se probó la afinidad de unión de variantes de paTCE de unión a PSMA desenmascarado (uTCE) que se une a PSMA, empleando cada variante una combinación diferente de anticuerpo contra PSMA/anticuerpo contra CD3. Se determinaron las afinidades de unión tanto al PSMA humano como de cino y al CD3 épsilon humano y de cino. Los valores son referidos a continuación en la Tabla 15 y la Tabla 16. También se determinó la temperatura de fusión para varias de estas variantes y es referida a continuación en la Tabla 17. Los datos de unión celular que comparan los uTCE de AC3092 (AMX-500-P1) y AC3896 (AMX-500-P4; también denominado aquí simplemente AMX-500) se muestran en la FIG. 10. Los valores de CE50 son referidos a continuación en la Tabla 18.

Tabla 15: Afinidades de unión a PSMA de uTCE de unión a PSMA seleccionados

AC	RS	aPSMA	aCD3	RS	Octet, huPSMA K_D(nM)	Octet, cyPSMA K_D(nM)	Biacore, huPSMA K_D(nM)	Biacore, cyPSMA K_D(nM)
uTCE de AC3092	2295	PSMA.5	CD3.23	2295	4,5	41,1	ND	ND
uTCE de AC3445	2295	PSMA.119	CD3.23	2295	6,2	47,5	ND	ND
uTCE de AC3896	3213	PSMA.350	CD3.228	3213	12,1	201	11,7	230
uTCE de AC3928	3213	PSMA.350	CD3.23	3213	13,2	198	19	354
uTCE de AC3934	3213	PSMA.262	CD3.228	3213	1,6	13,1	0,5	13

ND = No determinada.

Tabla 16 – Afinidades de unión a CD3 de uTCE que se unen a PSMA seleccionados

AC	RS	aPSMA	aCD3	RS	Octet, huCD3e K_D(nM)	Octet, cyCD3e K_D(nM)	Biacore, huCD3e K_D(nM)	Biacore, cyCD3e K_D(nM)
uTCE de AC3092	2295	PSMA.5	CD3.23	2295	71,9	64,6	ND	ND
uTCE de AC3445	2295	PSMA.119	CD3.23	2295	34,8	40	ND	ND
uTCE de AC3896	3213	PSMA.350	CD3.228	3213	33,2	38,8	12,8	13,7
uTCE de AC3928	3213	PSMA.350	CD3.23	3213	43	44,9	27,3	26,6
uTCE de AC3934	3213	PSMA.262	CD3.228	3213	26,6	33,7	9,83	10,39

ND = No determinada

Tabla 17 – Temperaturas de fusión

Num. AC	**Descripción**	**Tm (°C)**	**DT**
AC2330	control paTCE para dianas distintas de PSMA	67,71	0,0001
AC3896	AMX500-P4	70,92	0,0857
AC3896	AMX500-P4	70,53	0,0001
AC3928	AMX500-P6	68,01	0,1483
AC3928	AMX500-P6	67,61	0,0855
AC3934	AMX500-P7	70,97	0,0001
AC3934	AMX500-P7	70,43	0,0855

Tabla 18 – Valores de CE50 de unión a células CHO (nM) de paTCE que se unen a PSMA seleccionados

Línea Celular	**AMX-500-P1 (nM)**	**AMX-500-P4 (nM)**
Hu PSMA CHO	9,063	17,42
Cyno PSMA CHO	28,77	ND

Se eligió la molécula denominada AC3896 (AMX-500) para su caracterización adicional.

Se escrutaron los cabezas de serie de paTCE de unión a PSMA desenmascarados (uTCE) mediante BLI (Interferometría de Biocapa) o SPR (Resonancia de Plasmón de Superficie). Se determinó que los cabezas de serie de uTCE tenían una K_D en un rango de 1 nM a 100 nM contra PSMA humano y una K_D en un rango de 1 nM a 1000 nM

contra PSMA de mono cinomolgo. Se determinó que el paTCE de unión a PSMA enmascarado AMX-500 tenía una K_D de aproximadamente 546 nM y aproximadamente 2900 nM contra PSMA humano y de mono cinomolgo, respectivamente. El metabolito AMX-500(1x-N) de AMX-500 tiene una K_D de aproximadamente 230 nM y aproximadamente 2400 nM contra el PSMA humano y de mono cinomolgo, respectivamente. El metabolito AMX-500(1x-C) AMX-500 tiene una K_D de aproximadamente 353 nM y aproximadamente 2900 nM contra el PSMA humano y de mono cinomolgo, respectivamente. El AMX-500 completamente desenmascarado (uTCE) tiene una K_D de aproximadamente 44 nM y aproximadamente 410 nM contra el PSMA humano y de mono cinomolgo, respectivamente. Los valores son referidos a continuación en la Tabla 19 para PSMA y en la Tabla 20 para CD3.

Tabla 19 - Cinética de unión de AMX-500 y sus metabolitos para PSMA humano y de mono cinomolgo

Compuesto	PSMA humano			PSMA de cino		
	K_D (nM)	***k*a (M-1s-1)**	***k*d (s-1)**	**K_D (nM)**	***k*a (M-1s-1)**	***k*d (s-1)**
AMX-500	**546±29**	(2,3± 0,09)E4	(1,2± 0,03)E-2	**2900± 700**	(1,4±0,5)E4	(4,0±0,5)E-2
AMX-500 (1x-N)	**230±18**	(5,0±0,2)E4	(1,2± 0,05)E-2	**2400± 300**	(1,6±0,2)E4	(3,9±0,6)E-2
AMX-500 (1x-C)	**353±11**	(3,5±0,1)E4	(1,2± 0,03)E-2	**2900± 800**	(1,4±0,3)E4	(3,9± 0,09)E-2
AMX-500 (uTCE)	**44±1**	(2,7± 0,06)E5	(1,2±0,008)E-2	**410,1± 0,8**	(1,0± 0,01)E5	(4,3± 0,06)E-2

Tabla 20 - Cinética de unión de AMX-500 y sus metabolitos para CD3 humano y de mono cinomolgo

Compuesto	CD3 humano			CD3 de cino		
	K_D (nM)	***k*a (M-1s-1)**	***k*d (s-1)**	**K_D (nM)**	***k*a (M-1s-1)**	***k*d (s-1)**
AMX-500	**90±3**	(1,7± 0,09)E6	0,2± 0,004	**70±2**	(2,0± 0,07)E6	0,1±0,03
AMX-500 (1x-N)	**46,3± 0,3**	(2,8± 0,07)E6	0,1± 0,002	**38±1**	(2,9± 0,08)E6	0,1± 0,002
AMX-500 (1x-C)	**34,4± 0,6**	(3,2± 0,08)E6	0,1± 0,002	**26,7± 0,7**	(3,4± 0,09)E6	0,1± 0,0006
AMX-500 (uTCE)	**28±2**	(4,0±0,2)E6	0,1±0,01	**26±3**	(5±2)E6	0,1±0,05

Los datos de la cinética de unión citados anteriormente en la Tabla 19 demuestran que AMX-500, que comprende ambos polipéptidos de enmascaramiento, tiene una KD más alta para PSMA que el AMX-500 desenmascarado (uTCE). De manera similar, cada uno de los metabolitos del AMX-500 tiene una K_D más alta para PSMA que el AMX-500 desenmascarado. El metabolito AMX-500 1x-N carece del polipéptido de enmascaramiento vinculado al dominio de unión al antígeno CD3 y el metabolito AMX-500 1x-C carece del polipéptido de enmascaramiento conectado al dominio de unión al antígeno PSMA. La Tabla 19 demuestra adicionalmente que el dominio de unión al antígeno PSMA no reacciona de forma cruzada con el PSMA de cino. La Tabla 20 demuestra que el dominio de unión al antígeno CD3 se une a CD3 humano y de cino con una KD similar.

Ejemplo 5. Diseño de ELNN con código de barras mediante mutaciones mínimas en ELNN

Las secuencias de polipéptido ELNN pueden contener opcionalmente un fragmento de código de barras que se puede liberar del polipéptido tras la digestión mediante una proteasa. Un fragmento de código de barras puede ser, p. ej., (1) una porción del ELNN que incluye al menos parte de un motivo de secuencia (no recurrente, no solapante) que aparece sólo una vez dentro del ELNN; y (2) tiene una secuencia y un peso molecular que difieren de los de todos los demás fragmentos peptídicos que se pueden liberar del polipéptido que los contiene (p. ej., un paTCE) tras la digestión completa del polipéptido mediante una proteasa. El término “fragmento de código de barras” (“código de barras” o “secuencia de código de barras”) se puede referir a la porción del ELNN fusionada escindiblemente dentro del polipéptido o al fragmento peptídico resultante liberado del polipéptido. Las secuencias de códigos de barras anteriores (véase, p. ej., la solicitud de patente internacional PCT número WO2021/263058, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia) se diseñaron con la intención de crear secuencias polipeptídicas de códigos de barras únicas con mutaciones mínimas en la secuencia de ELNN original en la medida de lo posible. Sin embargo, tales secuencias de códigos de barras requirieron 1000 µg/ml de Glu-C y una digestión durante la noche para liberarlas de los péptidos que las contienen, tales como los paTCE. Las secuencias de polipéptidos de código de barras descritas en este Ejemplo se diseñaron y probaron para que funcionaran según un segundo criterio: que el polipéptido de código de barras se pueda liberar rápidamente del polipéptido ELNN (en aproximadamente dos horas frente a una digestión durante la noche)

mediante una concentración baja de proteasa (menos de 30 µg/ml proteasa); además del criterio de introducir la menor cantidad posible de mutaciones en la secuencia de ELNN original.

Para determinar qué secuencias peptídicas fueron escindidas más favorablemente por la proteasa Glu-C en una digestión con proteasa de dos horas, se construyó una biblioteca de aproximadamente 1000 péptidos, conteniendo cada péptido una secuencia de escisión diferente para la proteasa Glu-C. Se probaron concentraciones equimolares de estos péptidos que contienen sitios Glu-C en una digestión de 2 horas frente a un rango de concentraciones de proteasa Glu-C de 0,05 µg/ml a 1000 µg/ml de proteasa. Después de la digestión, los péptidos se analizaron mediante espectrometría de masas con cromatografía líquida. Se catalogaron las secuencias del sitio de escisión de Glu-C que fueron escindidas por las concentraciones más bajas de proteasa. De esta lista de las secuencias más rápidas, se seleccionaron unas pocas que eran más compatibles con los polipéptidos ELNN. A continuación, estas secuencias se implementaron para flanquear las nuevas secuencias de códigos de barras de “Generación 2”.

Se clonó una selección de secuencias de códigos de barras de Generación 2 en secuencias de ELNN y se probó su rendimiento como péptidos de códigos de barras mediante digestión con Glu-C y análisis posteriores de espectrometría de masas con cromatografía líquida. Las secuencias de códigos de barras satisfactorias de este experimento tenían 3 criterios: 1.) El péptido del código de barras se podía liberar completamente del polipéptido ELNN en una digestión de 2 horas mediante una concentración de 40 µg/ml de proteasa. 2.) El péptido de código de barras no fue escindido ni degradado de otro modo por concentraciones mucho más altas de proteasa, y 3.) El péptido de código de barras que cumplió las condiciones 1 y 2

contenía la menor cantidad de mutaciones de la secuencia del polipéptido ELNN original. A continuación, se muestran ejemplos de secuencias de códigos de barras de Generación 2 satisfactorias según los criterios del procedimiento de selección antes mencionado:

Tabla 21 – Secuencias de códigos de barras de generación 2 ilustrativas

Código de barras 01 Gen 2	SGPE.SGPGTGTSATPE.SGPG
Código de barras 02 Gen 2	ATPE.SGPGSGPGTSE.SATP
Código de barras 03 Gen 2	ATPE.SGPGTTPGTTPE.SGPG
Código de barras 04 Gen 2	ATPE.SGPGTPPTSTPE.SGPG
Código de barras 05 Gen 2	ATPE.SGPGTSPSATPE.SGPG
Código de barras 06 Gen 2	ATPE.SGPGTGSAGTPE.SGPG
Código de barras 07 Gen 2	ATPE.SGPGTGGAGTPE.SGPG
Código de barras 08 Gen 2	ATPE.SGPGTSPGATPE.SGPG
Código de barras 09 Gen 2	GTPE.SGPGTSGSGTPE.SGPG
Código de barras 10 Gen 2	GTPE.SGPGTSSASTPE.SGPG
Código de barras 11 Gen 2	GTPE.SGPGTGAGTTPE.SGPG
Código de barras 12 Gen 2	GTPE.SGPGTGSTSTPE.SGPG
Código de barras 13 Gen 2	GTPE.TPGSEPATSGSE.TGTP
Código de barras 14 Gen 2	GTPE.GSAPGTSTEPSE.SATP
Código de barras 15 Gen 2	ATPE.SGPGTAGSGTPE.SGPG
Código de barras 16 Gen 2	ATPE.SGPGTSSGGTPE.SGPG
Código de barras 17 Gen 2	ATPE.SGPGTAGPATPE.SGPG
Código de barras 18 Gen 2	ATPE.SGPGTPGTGTPE.SGPG
Código de barras 19 Gen 2	TTPE.SGPGTGGPTTPE.SGPG
Código de barras 20 Gen 2	STPE.SGPGTGSGSTPE.SGPG

Ejemplo 6. Secuencias de unión anti-CD3 mejoradas

La optimización del brazo scFv paTCE contra CD3 se realizó para reducir la inmunogenicidad de la molécula y mejorar la estabilidad, manteniendo al mismo tiempo la afinidad de unión con CD3 cercana a la afinidad observada para la molécula parental CD3.23.

Para lograr esto, se creó la Agrupación 1, que incluía 74 moléculas de paTCE, cada una de las cuales contenía PSMA.5 y una de las 74 variantes de mutación CD3.23. Las secuencias de aminoácidos de cada una de las 74 variantes de mutación CD3.23 se proporcionan en la Tabla 23a. Se eligieron mutaciones únicas en función de análisis que incluían el análisis de puntuación de PTE de CD3.23 (utilizando el algoritmo para PTE interno v12) y el análisis estructural. Las consideraciones estructurales incluyeron: posible interrupción del contacto, choques estéricos anticipados, mantenimiento de la carga de la cadena lateral y posible llenado de los bolsillos. Octet (ForteBio) evaluó la estabilidad y afinidad de las moléculas expresadas individualmente en forma de producto lisado bruto.

Según los resultados del escrutinio de la Agrupación 1, las mutaciones que no alteraron la afinidad y la estabilidad de la molécula de paTCE se continuaron evaluando como combinaciones en la Agrupación 2. La Agrupación 2 consistía en moléculas de paTCE, cada una de las cuales contenía PSMA.262 y una de las 64 variantes de combinaciones de mutaciones CD3.23. Las secuencias de aminoácidos de cada una de las 64 variantes de combinaciones de mutaciones CD3.23 se proporcionan en la Tabla 23b. Octet evaluó la estabilidad y afinidad de las moléculas expresadas individualmente en forma de producto lisado bruto. Las cuatro moléculas de paTCE más estables de la Agrupación 2 se expresaron adicionalmente en un volumen mayor (2,5 L) y se purificaron. La unión de estas moléculas anti-CD3 (CD3.227, CD3.228, CD3.229 y CD3.230) a CD3 humana y de cinomolgo se midió mediante Octet y la Tm se midió mediante fluorimetría diferencial de barrido. Todas las variantes se emparejaron con PSMA.262 excepto CD3.23, que se emparejó con PSMA.5. Los valores son referidos a continuación en la Tabla 22.

Tabla 22: Afinidades de unión, temperaturas de fusión y valores de PTE para anticuerpos contra CD3 seleccionados

Anticuerpo contra CD3	**K_D, huCD3e-Fc**	**kon (1/Ms), huCD3e-Fc**	**kdis (1/s), huCD3e-Fc**	**K_D, cyCD3e**	**kon (1/Ms), cyCD3e-Fc**	**kdis (1/s), cyCD3e-Fc**	**Puntuación de PTE (v22)**	**Tm**
CD3.227	57 nM	3,42E+05	1,96E-02	80 nM	3,15E+05	2,53E-02	10	63,71
CD3.228	69 nM	3,17E+05	2,17E-02	80 nM	3,34E+05	2,66E-02	10	64,45
CD3.229	162 nM	3,21E+05	5,20E-02	193 nM	3,17E+05	6,11E-02	15	63,46
CD3.230	195 nM	3,25E+05	6,33E-02	216 nM	3,36E+05	7,26E-02	15	63,71
CD3.23	131 nM	2,20E+05	2,89E-02	130 nM	2,40E+05	3,12E-02	73	62,62

Basándose en estos datos que incluyeron una evaluación adicional de la puntuación de PTE utilizando el algoritmo interno de PTE v22 (FIG. 6A) y una evaluación adicional de la estabilidad térmica para la cual los anticuerpos se calentaron a 60 °C durante 5 minutos (FIG. 6B), se eligió scFv de CD3.228. sobre las otros cabezas de serie en la Tabla 22.

A continuación, se proporciona un alineamiento de las moléculas CD3.9 y CD3.23 parentales y VL y VH de CD3.228 seleccionadas con las diferencias resaltadas. CD3.9 es una versión humanizada del anticuerpo monoclonal de ratón SP34. CD3.23 tiene 8 mutaciones en comparación con CD3.9 y tiene una afinidad estimada entre 2 y 4 veces menor que CD3.9 según ELISA, Octet y datos de unión celular. CD3.228 tiene 8 mutaciones en comparación con CD3.23 y 16 mutaciones en comparación con CD3.9.

CD3.228 tiene mayor estabilidad y menor riesgo de inmunogenicidad en comparación con CD3.23.

La numeración de las mutaciones se realiza según la base de datos de Kabat.

>CD3.9_VL

ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLT VL

>CD3.23_VL

ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL

>CD3.228_VL

ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKL TVL

CD3.9_VL ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQ APRGLIGGTNKRAPGT

CD3.23_VL ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPG QAPRGLIGGTNKRAPGT

CD3.228_VL ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPG QAPRGLIGGTNKRAPGT

********** . **** . **********

CD3.9_VL PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGG TKLTVL

CD3.23_VL PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGG
TKLTVL

CD3.228_VL PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGG
GTKLTVL

**********.*******.**********

T27N, T29S, E85V, S93P: diferencias con CD3.9

>CD3.9_VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS
KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS
YVSWFAYWGQGTLVTVSS

>CD3.23_VH

EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS
KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGNS
YVSWFAHWGQGTLVTVSS

>CD3.228_VH

EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT
KRNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNS
YVSWFAHWGQGTLVTVSS

CD3.9_VH EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGK
GLEWVARIRSKYNNYAT

CD3.23_VH EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGK
GLEWVARIRSKYNNYAT

CD3.228_VH EVQL***V***ESGGGIVQPGGSL***R***LSCAASGFTF***S***TYAMNWVRQAPG
KGLEWV***G***RIR***T***K***R***NNYAT

****.*****.*******.**********.**********.***.*.*****

CD3.9_VH YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF

GNSYVSWFAYWGQGTL

CD3.23_VH YYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENF

GNSYVSWFAHWGQGTL

CD3.228_VH YYADSVK***G***RFTISRDDSKNTVYLQMN***S***LKTEDTAVYYCVRHEN

FGNSYVSWFAHWGQGTL

******** ********** ***** ********** ********** ******

CD3.9_VH VTVSS

CD3.23_VH VTVSS

CD3.228_VH VTVSS

*****

L11I, A78V, G96E, Y102H: diferencias con CD3.9 compartidas entre CD3.23 y CD3.228

L5V, K19R, N30S, A49G, D65G, N82bS: Eliminación de PTE, no presente en CD3.9 o CD3.23

Tabla 23a. Variantes de mutación de CD3.23 de la agrupación 1

AC	**Secuencia de VL**	**VL SEQ ID**	**Secuencia de VH**	**VH SEQ ID**
AC3364	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	834	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	835
AC3366	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	836	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	837
AC3367	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	838	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEDVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	839

AC3368	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	840	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEEVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	841
AC3369	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	842	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWAARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	843
AC3370	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	844	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWEARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	845
AC3371	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	846	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWGARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	847
AC3372	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	848	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWSARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	849
AC3373	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	850	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWTARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	851
AC3374	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	852	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWWARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFG NSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	853
AC3375	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	854	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVDRIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	855
AC3376	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	856	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVERIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	857
AC3377	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	858	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	859
AC3378	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	860	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAQIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	861
AC3379	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL	862	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAGIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT	863

	GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL		VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	
AC3380	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	864	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAHIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	865
AC3381	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	866	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAPIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	867
AC3382	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	868	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAWIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	869
AC3383	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	870	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARAR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFG NSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	871
AC3384	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	872	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARGR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFG NSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	873
AC3385	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	874	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARTR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TVYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFG NSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	875
AC3386	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	876	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARINS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	877
AC3387	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	878	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIDS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	879
AC3388	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	880	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIES KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	881
AC3389	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	882	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIQS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	883
AC3390	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	884	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIGS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	885

AC3391	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	886	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIHS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	887
AC3392	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	888	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIWS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	889
AC3393	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	890	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRN KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	891
AC3394	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	892	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRD KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	893
AC3395	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	894	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRE KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	895
AC3396	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	896	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRT KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	897
AC3397	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	898	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS PYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	899
AC3398	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	900	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KANNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	901
AC3399	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	902	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KRNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	903
AC3400	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	904	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KGNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	905
AC3401	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	906	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KKNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	907
AC3402	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL	908	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KPNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT	909

	GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL		VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	
AC3403	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	910	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KTNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	911
AC3404	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	912	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KWNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	913
AC3405	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	914	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYDNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	915
AC3406	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	916	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYENYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	917
AC3407	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	918	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNDYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	919
AC3408	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	920	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNEYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	921
AC3409	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	922	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNGATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	923
AC3410	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	924	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNFATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	925
AC3411	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	926	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNWATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	927
AC3412	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	928	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYGTYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	929
AC3413	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	930	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYTTYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	931

AC3414	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	932	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATDYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	933
AC3415	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	934	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATEYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	935
AC3416	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	936	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATTYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	937
AC3417	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	938	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYDADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	939
AC3418	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	940	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYEADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	941
AC3419	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	942	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYQADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	943
AC3420	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	944	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYGADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	945
AC3421	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	946	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYWADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	947
AC3422	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	948	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYKDSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	949
AC3423	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	950	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYPDSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	951
AC3424	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	952	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	953
AC3425	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL	954	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT	955

	GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL		VDLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	
AC3426	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	956	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VGLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	957
AC3427	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	958	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VSLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	959
AC3428	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	960	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNELKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	961
AC3429	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	962	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNQLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	963
AC3430	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	964	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	965
AC3431	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	966	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNYLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	967
AC3432	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	968	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRS KYNNGATYYADSVKGRFTISRDDSKNT VYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	969
AC3433	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLQ GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	970	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	971
AC3434	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLE GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	972	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	973
AC3435	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLD GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	974	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	975
AC3436	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSSL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	976	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	977

AC3437	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSKL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	978	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	979
AC3438	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSNL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	980	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	981
AC3439	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSTL GGKAALTLSGVQPEDEAVYYCAL WYPNLWVFGGGTKLTVL	982	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT VYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHENFGN SYVSWFAHWGQGTLVTVSS	983

Tabla 23a cont. Variantes de mutación de CD3.23 de la agrupación 1

AC	Dominio CD3.23	Mutación	Puntuación de PTE v12	Expresión Relativa (1 – expresión más baja, 5 - expresión más alta - evaluada mediante electroforesis en gel de PEG)	K_D primaria (nM)	% Restante después del calenta-miento
AC3364	CD3.23-L7	WT	50	4	8,5	56,90 %
AC3366	CD3.23-D	WT	50	3	14,0	28,73 %
AC3367	CD3.38	W47D	41	4	40,2	ND
AC3368	CD3.39	W47E	42	4	18,1	0
AC3369	CD3.40	V48A	38	4	8,3	0
AC3370	CD3.41	V48E	38	4	164,8	ND
AC3371	CD3.42	V48G	38	4	71,5	ND
AC3372	CD3.43	V48S	38	4	11,2	0
AC3373	CD3.44	V48T	38	4	5,7	0
AC3374	CD3.45	V48W	40	4	34270,0	ND
AC3375	CD3.46	A49D	48	4	Unión débil	ND
AC3376	CD3.47	A49E	46	4	Sin unión	ND
AC3377	CD3.48	A49G	45	4	4,5	79,06 %
AC3378	CD3.49	R50Q	39	4	Sin unión	ND
AC3379	CD3.50	R50G	39	4	Sin unión	ND
AC3380	CD3.51	R50H	41	4	Sin unión	ND
AC3381	CD3.52	R50P	39	4	Sin unión	ND
AC3382	CD3.53	R50W	39	2	Sin unión	ND
AC3383	CD3.54	I51A	45	2	1182,0	ND
AC3384	CD3.55	I51G	42	2	Unión débil	ND

AC3385	CD3.56	I51T	44	2	424,6	ND
AC3386	CD3.57	R52N	39	2	Sin unión	ND
AC3387	CD3.58	R52D	35	2	Sin unión	ND
AC3388	CD3.59	R52E	35	2	Sin unión	ND
AC3389	CD3.60	R52Q	48	2	434,4	ND
AC3390	CD3.61	R52G	41	2	Sin unión	ND
AC3391	CD3.62	R52H	50	2	Sin unión	ND
AC3392	CD3.63	R52W	42	2	Sin unión	ND
AC3393	CD3.64	S52aN	48	2	Unión débil	ND
AC3394	CD3.65	S52aD	42	4	Sin unión	ND
AC3395	CD3.66	S52aE	42	4	Sin unión	ND
AC3396	CD3.67	S52aT	49	4	4,8	60,06 %
AC3397	CD3.68	K52bP	45	4	51,0	ND
AC3398	CD3.69	Y52cA	37	4	11,5	14,99 %
AC3399	CD3.70	Y52cR	38	4	3,8	56,68 %
AC3400	CD3.71	Y52cG	36	4	20,1	0
AC3401	CD3.72	Y52cK	40	4	5,1	60,72 %
AC3402	CD3.73	Y52cP	36	4	33,1	ND
AC3403	CD3.74	Y52cT	36	4	11,1	35,59 %
AC3404	CD3.75	Y52cW	48	4	10,5	15,25 %
AC3405	CD3.76	N53D	34	4	Sin unión	ND
AC3406	CD3.77	N53E	34	4	574,6	ND
AC3407	CD3.78	N54D	37	4	7,4	61,45 %
AC3408	CD3.79	N54E	42	4	8,3	43,27 %
AC3409	CD3.80	Y55G	34	4	11,3	0
AC3410	CD3.81	Y55F	44	4	6,1	23,50 %
AC3411	CD3.82	Y55W	38	4	7,8	6,79 %
AC3412	CD3.83	A56G	49	4	8,2	9,14 %
AC3413	CD3.84	A56T	49	4	10,7	26,45 %
AC3414	CD3.85	Y58D	35	4	938,6	ND
AC3415	CD3.86	Y58E	35	4	183,4	ND
AC3416	CD3.87	Y58T	35	4	17,9	26,86 %
AC3417	CD3.88	Y59D	42	4	63,2	ND
AC3418	CD3.89	Y59E	42	4	9,7	0
AC3419	CD3.90	Y59Q	42	4	7,2	0
AC3420	CD3.91	Y59G	42	4	8,3	0
AC3421	CD3.92	Y59W	42	4	37,2	ND
AC3422	CD3.93	A60K	37	4	8,0	0
AC3423	CD3.94	A60P	35	4	8,2	0
AC3424	CD3.95	D65G	46	4	5,4	47,80 %

AC3425	CD3.96	Y79D	31	4	9,8	0
AC3426	CD3.97	Y79G	31	2	121,1	ND
AC3427	CD3.98	Y79S	31	4	9,6	0
AC3428	CD3.99	N82bE	39	4	5,9	39,70 %
AC3429	CD3.100	N82bQ	40	4	7,1	18,12 %
AC3430	CD3.101	N82bS	32	4	4,8	4,22 %
AC3431	CD3.102	N82bY	46	4	5,2	1,66 %
AC3432	CD3.103	A49G, Y52cG, D65G, N82bS	8	4	11,4	0
AC3433	CD3.104	L67Q	55	4	4,6	59,68 %
AC3434	CD3.105	G68E	54	4	4,9	70,99 %
AC3435	CD3.106	L67D	50	4	6,1	43,75 %
AC3436	CD3.107	L66S	50	4	7,3	0
AC3437	CD3.108	L66K	50	4	3,2	0
AC3438	CD3.109	L66N	50	4	8,3	0
AC3439	CD3.110	L66T	50	4	8,9	0

Tabla 23b. Variantes de combinaciones de mutaciones de CD3.23 de la agrupación 2

AC	**Secuencia de VL**	**VL SEQ ID**	**Secuencia de VH**	**VH SEQ ID**
AC3632	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	700	EVQLLESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKRNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	701
AC3633	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	702	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKRNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	703
AC3634	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	704	EVQLLESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKTNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	705
AC3635	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	706	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKTNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	707

AC3636	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	708	EVQLLESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNDYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	709
AC3637	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	710	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNDYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	711
AC3638	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	712	EVQLLESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNNYATTYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	713
AC3639	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	714	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNNYATTYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	715
AC3640	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	716	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKRNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	717
AC3641	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	718	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKRNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	719
AC3642	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	720	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKTNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	721
AC3643	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	722	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKTNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	723
AC3644	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	724	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNDYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	725
AC3645	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	726	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNDYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR	727

			HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	
AC3646	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	728	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKRNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	729
AC3647	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	730	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKTNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	731
AC3648	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	732	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNDYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	733
AC3649	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	734	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNNYATTYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	735
AC3650	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	736	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	737
AC3651	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	738	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	739
AC3652	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	740	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKTNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	741
AC3653	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	742	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKTNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	743
AC3654	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	744	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKYNDYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	745
AC3655	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG	746	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKYNDYATYYADSVKGRFTISRD	747

	GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL		DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	
AC3656	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	748	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKYNNYATTYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	749
AC3657	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	750	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKYNNYATTYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	751
AC3658	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	752	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	753
AC3659	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	754	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	755
AC3660	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	756	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKTNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	757
AC3661	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	758	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKTNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	759
AC3662	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	760	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKYNDYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	761
AC3663	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	762	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKYNDYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	763
AC3664	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	764	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKYNNYATTYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	765
AC3665	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP	766	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG	767

	RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL		RIRTKYNNYATTYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	
AC3666	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	768	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNEYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	769
AC3667	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	770	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNNGATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	771
AC3668	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	772	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNNGATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	773
AC3669	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	774	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRTKYNNYATTYADSVKDRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	775
AC3670	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	776	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKRNNYATTYADSVKDRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	777
AC3671	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	778	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKKNNYATTYADSVKDRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	779
AC3672	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	780	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKTNNYATTYADSVKDRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	781
AC3673	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	782	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNDYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	783
AC3674	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	784	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNEYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	785

AC3675	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	786	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNNGATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	787
AC3676	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	788	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNNGATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNELKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	789
AC3677	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	790	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRTKYNNYATTYADSVKDRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	791
AC3678	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	792	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKRNNYATTYADSVKDRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	793
AC3679	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	794	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKKNNYATTYADSVKDRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	795
AC3680	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	796	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKTNNYATTYADSVKDRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	797
AC3681	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	798	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKYNNYATTYADSVKDRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	799
AC3682	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	800	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKRNNYATTYADSVKDRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	801
AC3683	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	802	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKKNNYATTYADSVKDRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	803
AC3684	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	804	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKTNNYATTYADSVKDRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR	805

			HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	
AC3685	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	806	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKYNNYATTYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	807
AC3686	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	808	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKRNNYATTYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	809
AC3687	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	810	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKKNNYATTYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	811
AC3688	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	812	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKTNNYATTYADSVKDRFTISRDDSKNTVYLQMNELKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	813
AC3689	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	814	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKYNNYATTYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	815
AC3690	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	816	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKRNNYATTYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	817
AC3691	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	818	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKKNNYATTYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	819
AC3692	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	820	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKTNNYATTYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	821
AC3693	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAVYYCALWYPNLWVFGGGTKLTVL	822	EVQLVESGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKRNNYATTYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNELKTEDTAVYYCVRHENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVSS	823
AC3694	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSNGAVTSSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG	824	EVQLVESGGGIVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISRD	825

	GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL		DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	
AC3695	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	826	EVQLVESGGGIVQPGGSLKLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRTKRNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	827
AC3471	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	828	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRD DSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	829
AC3432	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	830	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNNGATYYADSVKGRFTISRD DSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	831
AC2717	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS SNGAVTSSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAVYYCALW YPNLWVFGGGTKLTVL	832	EVQLLESGGGIVQPGGSLKLSCAAS GFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRD DSKNTVYLQMNNLKTEDTAVYYCVR HENFGNSYVSWFAHWGQGTLVTVS S	833

Tabla 23b cont. Variantes de combinaciones de mutaciones de CD3.23 de la agrupación 2

AC	Dominio CD3.23	Mutación	Puntuación de PTE v12	Puntuación de PTE v22	Nivel de Expresión **	Razón de Expresion ***	Escrutinio Primario de huCD3e (nM)	% Restante de estabilidad
AC3632	CD3.201	K19R, A49G, Y52cR, D65G, N82bS	9	18	3050,0	1,2	8,6	55,24 %
AC3633	CD3.202	L5V, K19R, A49G, Y52cR, D65G, N82bS	9	18	2220,0	0,9	8,4	60,79 %
AC3634	CD3.203	K19R, A49G, Y52cT, D65G, N82bS	10	19	ND	ND	ND	ND
AC3635	CD3.204	L5V, K19R, A49G,	10	19	1870,0	0,8	7,2	36,92 %

		Y52cT, D65G, N82bS						
AC3636	CD3.205	K19R, A49G, N54D, D65G, N82bS	10	19	3000,0	1,2	7,2	58,50 %
AC3637	CD3.206	L5V, K19R, A49G, N54D, D65G, N82bS	10	19	1450,0	0,6	10,3	28,98 %
AC3638	CD3.207	K19R, A49G, Y58T, D65G, N82bS	12	21	2420,0	1,0	15,6	1,01 %
AC3639	CD3.208	L5V, K19R, A49G, Y58T, D65G, N82bS	12	21	2400,0	1,0	16,8	24,61 %
AC3640	CD3.209	L5V, K19R, A49G, Y52cR, D65G, N82bE	16	25	2280,0	0,9	5,6	37,31 %
AC3641	CD3.210	L5V, K19R, N30S, A49G, Y52cR, D65G, N82bE	16	25	2120,0	0,9	5,7	69,25 %
AC3642	CD3.211	L5V, K19R, A49G, Y52cT, D65G, N82bE	17	26	2610,0	1,1	9,5	29,37 %
AC3643	CD3.212	L5V, K19R, N30S, A49G, Y52cT, D65G, N82bE	17	26	890,0	0,4	35,6	9,81 %
AC3644	CD3.213	L5V, K19R, A49G, N54D, D65G, N82bE	17	26	3280,0	1,2	6,6	57,91 %
AC3645	CD3.214	L5V, K19R,	17	26	3420,0	1,3	6,6	67,42 %

		N30S, A49G, N54D, D65G, N82bE						
AC3646	CD3.215	L5V, K19R, N30S, A49G, Y52cR, D65G, N82bS	9	18	2020,0	0,8	9,7	54,85 %
AC3647	CD3.216	L5V, K19R, N30S, A49G, Y52cT, D65G, N82bS	10	19	2100,0	0,8	11,2	61,45 %
AC3648	CD3.217	L5V, K19R, N30S, A49G, N54D, D65G, N82bS	10	19	1040,0	0,4	10,7	31,11 %
AC3649	CD3.218	L5V, K19R, N30S, A49G, Y58T, D65G, N82bS	12	21	800,0	0,3	52,6	3,83 %
AC3650	CD3.219	L5V, K19R, A49G, S52aT, Y52cR, D65G, N82bE	10	17	2010,0	0,8	4,7	57,93 %
AC3651	CD3.220	L5V, K19R, N30S, A49G, S52aT, Y52cR, D65G, N82bE	10	17	1950,0	0,7	4,8	63,19 %
AC3652	CD3.221	L5V, K19R, A49G, S52aT, Y52cT, D65G, N82bE	15	22	2600,0	1,0	11,7	5,17 %
AC3653	CD3.222	L5V, K19R, N30S, A49G, S52aT, Y52cT,	15	22	2440,0	0,9	10,8	33,59 %

		D65G, N82bE						
AC3654	CD3.223	L5V, K19R, A49G, S52aT, N54D, D65G, N82bE	17	24	2890,0	1,1	6,0	68,99 %
AC3655	CD3.224	L5V, K19R, N30S, A49G, S52aT, N54D, D65G, N82bE	17	24	2530,0	1,0	6,4	52,55 %
AC3656	CD3.225	L5V, K19R, A49G, S52aT, Y58T, D65G, N82bE	19	26	3110,0	1,0	19,5	37,24 %
AC3657	CD3.226	L5V, K19R, N30S, A49G, S52aT, Y58T, D65G, N82bE	19	26	1320,0	0,4	50,9	8,94 %
AC3658	CD3.227	L5V, K19R, A49G, S52aT, Y52cR, D65G, N82bS	3	10	2850,0	1,0	8,2	62,96 %
AC3659	CD3.228	L5V, K19R, N30S, A49G, S52aT, Y52cR, D65G, N82bS	3	10	2750,0	0,9	6,2	80,86 %
AC3660	CD3.229	L5V, K19R, A49G, S52aT, Y52cT, D65G, N82bS	8	15	3310,0	1,1	11,9	51,28 %
AC3661	CD3.230	L5V, K19R, N30S, A49G, S52aT, Y52cT,	8	15	2740,0	0,9	17,0	62,00 %

		D65G, N82bS						
AC3662	CD3.231	L5V, K19R, A49G, S52aT, N54D, D65G, N82bS	10	17	3590,0	1,2	5,1	54,69 %
AC3663	CD3.232	L5V, K19R, N30S, A49G, S52aT, N54D, D65G, N82bS	10	17	3890,0	1,3	5,1	74,10 %
AC3664	CD3.233	L5V, K19R, A49G, S52aT, Y58T, D65G, N82bS	12	19	3310,0	1,1	24,9	15,01 %
AC3665	CD3.234	L5V, K19R, N30S, A49G, S52aT, Y58T, D65G, N82bS	12	19	3310,0	1,1	17,4	13,49 %
AC3666	CD3.235	L5V, K19R, A49G, N54E, D65G, N82bS	14	23	3620,0	1,2	6,5	63,15 %
AC3667	CD3.236	L5V, K19R, A49G, D65G, N82bS	8	17	3180,0	1,1	21,9	0,65 %
AC3668	CD3.237	L5V, K19R, A49G, D65G, N82bE	15	24	690,0	0,3	22,2	0
AC3669	CD3.238	L5V, K19R, S52aT, Y58T, N82bS	16	23	1680,0	0,7	23,1	-5,55 %
AC3670	CD3.239	L5V, K19R, Y52cR, Y58T, N82bS	14	21	1590,0	0,7	29,9	-12,81 %

AC3671	CD3.240	L5V, K19R, Y52cK, Y58T, N82bS	16	23	1790,0	0,7	16,5	-25,28 %
AC3672	CD3.241	L5V, K19R, Y52cT, Y58T, N82bS	14	21	2280,0	0,9	92,6	-183,07 %
AC3673	CD3.242	L5V, K19R, A49G, N54D, D65G, V78L, N82bS	9	18	2620,0	1,1	7,7	34,70 %
AC3674	CD3.243	L5V, K19R, A49G, N54E, D65G, V78L, N82bS	13	22	ND	ND	ND	ND
AC3675	CD3.244	L5V, K19R, A49G, D65G, V78L, N82bS	7	16	740,0	0,3	43,6	-43,16 %
AC3676	CD3.245	L5V, K19R, A49G, D65G, V78L, N82bE	17	26	2490,0	1,0	19,3	-65,26 %
AC3677	CD3.246	L5V, K19R, S52aT, Y58T, V78L, N82bS	15	22	1970,0	0,8	35,2	-0,10 %
AC3678	CD3.247	L5V, K19R, Y52cR, Y58T, V78L, N82bS	13	20	1880,0	0,8	28,9	-59,35 %
AC3679	CD3.248	L5V, K19R, Y52cK, Y58T, V78L, N82bS	15	22	1700,0	0,7	49,2	-25,51 %
AC3680	CD3.249	L5V, K19R, Y52cT, Y58T,	13	20	3180,0	1,0	128,0	-193,59 %

		V78L, N82bS						
AC3681	CD3.250	L5V, K19R, A49G, S52aT, Y58T, N82bS	12	19	2950,0	0,9	31,0	5,62 %
AC3682	CD3.251	L5V, K19R, A49G, Y52cR, Y58T, N82bS	8	17	2730,0	0,9	32,8	11,12 %
AC3683	CD3.252	L5V, K19R, A49G, Y52cK, Y58T, N82bS	9	19	2280,0	0,7	22,9	-13,59 %
AC3684	CD3.253	L5V, K19R, A49G, Y52cT, Y58T, N82bS	10	19	2900,0	0,9	79,9	-105,16 %
AC3685	CD3.254	L5V, K19R, A49G, S52aT, Y58T, N82bE	19	26	2650,0	0,8	32,3	24,18 %
AC3686	CD3.255	L5V, K19R, A49G, Y52cR, Y58T, N82bE	15	24	2110,0	0,7	22,4	32,74 %
AC3687	CD3.256	L5V, K19R, A49G, Y52cK, Y58T, N82bE	16	26	ND	ND	ND	ND
AC3688	CD3.257	L5V, K19R, A49G, Y52cT, Y58T, N82bE	17	26	2970,0	0,9	159,0	-92,57 %
AC3689	CD3.258	L5V, K19R, A49G, S52aT, Y58T, V78L, N82bS	11	18	2840,0	0,9	38,0	22,13 %
AC3690	CD3.259	L5V, K19R,	7	16	2540,0	0,8	29,4	14,38 %

		A49G, Y52cR, Y58T, V78L, N82bS						
AC3691	CD3.260	L5V, K19R, A49G, Y52cK, Y58T, V78L, N82bS	8	18	2730,0	0,9	45,6	27,07 %
AC3692	CD3.261	L5V, K19R, A49G, Y52cT, Y58T, V78L, N82bS	9	18	2200,0	0,9	97,0	-122,00 %
AC3693	CD3.262	L5V, K19R, A49G, Y52cR, Y58T, V78L, N82bE	17	26	2100,0	0,9	25,4	-4,58 %
AC3694	CD3.263	L5V, A49G, S52aT, Y52cR, D65G, N82bS	17	26	2050,0	0,8	7,2	53,06 %
AC3695	CD3.264	L5V, N30S, A49G, S52aT, Y52cR, D65G, N82bS	17	26	2500,0	1,0	4,5	55,56 %
AC3471	CD3.23	WT	50	73	2738,0	1,0	13,5	63,73 %
AC3432 *	CD3.103	A49G, Y52cG, D65G, N82bS	8	33	3843,3	1,3	13,5	21,44 %
AC2717 *	CD3.23	WT	50	73	3723,3	1,3	12,9	73,42 %

* AC3432 y AC2717 emparejados con PSMA.5.

**Estos valores son lecturas arbitrarias de los datos de Octet. Un número mayor significa que se presenta más proteína.

***Estos valores son razones comparadas con el nivel de expresión de CD3.23. Una razón más alta significa un nivel de expresión más alto en comparación con la expresión de CD3.23.

Ejemplo 7. Modificación genética del sitio de liberación

La incubación de un paTCE que comprende RSR-2295 en plasma humano mostró cierta escisión que, aunque no alta, fue inesperada. Investigaciones adicionales revelaron que la escisión se debió sorprendentemente a la legumaína, que anteriormente se creía que estaba específicamente presente en los tejidos tumorales. Además, inicialmente se creía que la escisión por legumaína proporcionaba niveles significativos de activación de paTCE en los tejidos tumorales.

Se diseñó un nuevo sitio de liberación para evitar la escisión por la legumaína, lo que dio como resultado RSR-3213. Sorprendentemente, un paTCE que contenía secuencias de liberación RSR-3213 se escindió menos en plasma, pero en cantidades comparables a un paTCE correspondiente que comprendía secuencias de liberación RSR-2295 en múltiples tipos de tumores (incluidos tumores de carcinoma gástrico (NCI-N87), adenocarcinoma colorrectal (HT-29), de carcinoma de colon (HT-55). Por tanto, los paTCE que comprenden RSR-3213 tienen una especificidad mejorada para los tejidos tumorales sin una pérdida significativa de activación en los tejidos tumorales.

Digestión *in vitro*:

Se realizaron ensayos de digestión *in vitro* para demostrar que RSR-3213 es escindida por MMP y ST14/matriptasa, pero no por legumaína. Se digirieron dos moléculas de paTCE dirigidos a EpCAM (EpCAM-paTCE) (una que tiene RSR-2295 en ambos lados del TCE y la otra que tiene RSR-3213 en ambos lados del TCE) que flanquean el núcleo del TCE con diluciones 1:5 de MMP9, legumaína o ST14/matriptasa. Se

observaron patrones de bandas similares tanto para MMP9 como para matriptasa, lo que sugiere que la mutación del sitio de escisión por legumaína no afectaba a la capacidad de escisión de los sitios de escisión por MMP y serina proteasa. Se observó uTCE para el paTCE que contenía RSR-2295 después de la digestión con legumaína, lo que indica escisión en el conector escindible por proteasa por legumaína. No se observó uTCE para el paTCE que contenía RSR-3213 después de la digestión con legumaína, lo que indica que la mutación evitó con éxito la escisión en el conector escindible de proteasa por legumaína (FIG. 7A y FIG. 7B).

Estabilidad en plasma: capacidad de escisión *in vivo*

Las variantes marcadas con fluorescencia de un EpCAM-paTCE que contenía RSR-2295 o RSR-3213 se marcaron con Sulfo-Cy5.5 o Sulfo-Cy7.5. Se inyectaron colores opuestos en ratones que contenían tumores de xenoinjerto NCI-N87, HT-29 o HT-55. A las 48 horas de la inyección, se recogieron los tumores, se homogeneizaron y se analizaron los extractos de proteínas mediante SDS-PAGE y LI-COR. Se cuantificaron las abundancias relativas de paTCE, 1x-C, 1x-N y uTCE. No se observaron diferencias significativas en uTCE y 1x-C entre los dos conectores escindibles por proteasa. El paTCE que contenía RSR-2295 mostró un aumento pequeño, pero estadísticamente significativo (como promedio, 2,19 % más) en 1x-N que el paTCE correspondiente que contenía RSR-3213. (FIG. 8A y FIG. 8B).

La capacidad de escisión observada *in vivo* a partir de productos homogeneizados de tumores también se determinó a partir de 3 modelos de tumores de ratón diferentes. El % de abundancia de los metabolitos 1x-C, 1x-N y uTCE se midió con los resultados representados en la FIG. 8C. Finalmente, la FIG. 8D representa

el % del total de paTCE más los 3 metabolitos (1x-N, 1x-C y uTCE) cuando se emplea RSR-2295 o RSR-3213.

En conjunto, estos datos sugieren que las diferencias entre la capacidad escisión *in vivo* de RSR-2295 y RSR-3213 son menores en 3 modelos tumorales diferentes.

Captación tumoral:

La captación tumoral entre EpCAM-paTCE que contienen RSR-2295 o RSR-3213 se comparó utilizando la razón de concentraciones calculadas del fármaco total (paTCE, 1x-C, 1x-N y uTCE). Si bien se observaron diferencias en la captación tumoral en 3 modelos tumorales diferentes, no se observaron diferencias significativas entre RSR-2295 y RSR-3213 dentro de cada modelo. Esto indica que los cambios en los conectores escindibles por proteasa entre RSR-2295 y RSR-3213 no afectan a la captación tumoral de paTCE (FIG. 9).

Ejemplo 8. AMX-500, un TCE activado por proteasa dirigido a PSMA ilustrativo

Este ejemplo proporciona datos relacionados con un paTCE ilustrativo, denominado AMX-500.

Método de producción de AMX-500

Los métodos para producir proteínas paTCE se conocen en la técnica, p. ej., como se describe en la Publicación de Patente Internacional PCT Núm. WO2017/040344. Por ejemplo, paTCE se expresó en E. coli, que se transformó con un vector de expresión que codificaba paTCE y se cultivó en fermentación. Los cultivos de fermentación se desarrollaron con medio complejo libre de animales a 37 °C y la temperatura se cambió a 26 °C antes del agotamiento del

fosfato, lo que desencadenó la inducción (PhoA). La proteína diana se dividió en el periplasma mediante una secuencia líder secretora N-terminal, que se escindió durante la translocación. Durante la cosecha, el caldo completo de fermentación se centrifugó para sedimentar las células que contenían el producto, que se retuvieron y congelaron a ≤ −70 °C. El sedimento celular congelado se resuspendió y, una vez homogéneo, la resuspensión se lisó mecánicamente y se refrigeró. El producto lisado enfriado se centrifugó (12.000 RCF, 10 °C, 30 min) y el sobrenadante se decantó y se retuvo, mientras que el sedimento se descartó. Al día siguiente, se realizó nuevamente la centrifugación (12.000 RCF, 10 °C, 30 min) y el sobrenadante se decantó, se filtró submicrónicamente y se purificó mediante un procedimiento cromatográfico que comprendía una etapa de cromatografía de Intercambio Aniónico (AEX). Las proteínas paTCE y sus derivados se prepararon como soluciones acuosas y se almacenaron congeladas a ≤ −70 °C y, después se descongelaron, a temperaturas entre 2 °C y 8 °C.

A continuación, se proporciona una secuencia de nucleótidos ilustrativa para la producción de AMX-500:

GCATCTTCGGCGACGCCGGAAAGCGGTCCGGGTACGTCCACCGAACCGAGCG
AGGGTAGCGCTCCGGGCACCAGCGAGTCCGCGACCCCGGAAAGCGGTCCGG
GTAGCGGTCCGGGCACCTCCGAGAGCGCGACCCCGGGCACCTCTGAATCAGC
CACCCCGGAGTCTGGCCCAGGTAGCGAGCCGGCAACCTCTGGCAGCGAAACC
CCGGGCACCAGCGAATCCGCGACGCCAGAGAGCGGTCCGGGCACCTCTACG
GAGCCTAGCGAGGGCTCAGCACCAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCCGACGTCAA
CCGAGGAAGGTACAAGCGAAAGCGCCACCCCTGAGTCGGGCCCTGGCAGCGA
ACCGGCAACTAGCGGCAGCGAGACTCCGGGTACCAGCGAGTCTGCTACGCCA
GAGAGCGGCCCAGGTTCGCCAGCGGGTTCGCCGACTAGCACGGAGGAGGGC

AGCCCAGCGGGTAGCCCTACCAGCACTGAAGAGGGTACGTCCACCGAACCGA

GCGAAGGTAGCGCACCAGGTACCTCCGAGTCTGCCACCCCTGAATCCGGTCC

AGGTACCAGCGAATCAGCCACCCCGGAGTCGGGTCCAGGTACGAGCGAATCT

GCTACCCCGGAATCCGGCCCAGGCAGCGAACCTGCTACTAGCGGCAGCGAAA

CGCCGGGCAGCGAACCTGCCACGTCAGGCAGCGAGACGCCGGGTTCCCCTG

CAGGCTCCCCGACCAGCACTGAGGAGGGCACCTCCACCGAACCATCAGAAGG

TAGCGCGCCTGGTACGTCAACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCACCGGGTTCA

GAACCAGCTACGTCTGGGAGCGAGACCCCGGGCACCTCCGAGTCGGCGACCC

CGGAGGCAGGTCGTTCTGCTAGCCATACCCCTGCAGGGTTAACTGGCCCCGG

AACTTCAGAAAGTGCTACACCCGAGTCTCAGGTTCAACTGGTGGAGAGCGGTG

GCGGTGTGGTTCAGCCGGGTCGTAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGAGCG

GTCGTACCTTTGGTATCTATGTGTGGGGTTGGTTTCGTCAGGCGCCGGGCAAG

GAGCGTGAATTCGTGGGCGCGATGAGCTGGAGCGGTAGCAACCGTAAAGTGA

GCGACAGCGTTAAGGGCCGTTTTACCATTAGCCGTGATAACAGCAAAAACACC

CTGTACCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAGGACACCGCGGTTTACTATTG

CGCGGCGAGCAACAAAGAATATGGCCGTACCTGGTATGATTTCAATGAGAGCG

ACTACTGGGGCCAAGGCACCCAAGTGACCGTTAGCAGCGGGGGAGGCGGAAG

TGGTGGAGGGTCAGAGTTAGTTGTGACCCAAGAGCCGAGCCTGACCGTTAGC

CCGGGTGGTACGGTCACCCTGACGTGCCGTAGCAGCAACGGTGCGGTCACGA

GCAGCAACTATGCCAATTGGGTCCAGCAGAAACCGGGTCAAGCACCGCGTGG

CCTGATCGGCGGCACCAATAAACGTGCCCCGGGTACTCCTGCGCGTTTCTCCG

GTAGCCTGCTGGGCGGCAAAGCCGCTCTGACCCTGAGCGGTGTCCAGCCGGA

AGATGAAGCGGTGTACTACTGCGCGCTGTGGTATCCGAATCTGTGGGTTTTTG

GCGGCGGTACCAAGCTGACCGTATTGAGCGAGAGCGCAACGCCAGAGAGCGG

TCCAGGCACCAGCCCAGGTGCCACCCCTGAGAGCGGCCCAGGTACTTCTGAG

AGCGCCACTCCGGAGGTCCAACTGGTGGAGTCTGGTGGTGGCATTGTTCAACC
GGGTGGCTCGTTGCGCCTGAGCTGTGCAGCTAGCGGCTTTACCTTCAGCACCT
ATGCGATGAATTGGGTTCGTCAGGCACCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGG
CCGTATCCGCACCAAGCGCAACAACTACGCGACCTACTACGCGGATAGCGTTA
AAGGCCGCTTCACGATTAGCCGTGACGATTCCAAGAATACGGTGTATCTGCAAA
TGAACAGCCTGAAAACCGAAGATACCGCGGTGTATTACTGTGTGCGCCACGAA
AATTTCGGCAACAGCTACGTGAGCTGGTTTGCACATTGGGGTCAGGGCACCCT
GGTTACGGTGAGCTCCGGTACAGCTACTCCAGAATCAGGACCCGGGGAAGCT
GGAAGAAGCGCCTCACACACACCAGCTGGACTTACAGGCCCGGCTACTCCCG
AAAGTGGGCCAGGAACATCAGAGTCCGCGACCCCGGAAAGCGGTCCGGGTTC
TCCAGCTGGCAGCCCGACCTCCACTGAAGAAGGCACCTCTGAGTCTGCTACCC
CTGAATCTGGTCCTGGCTCCGAACCTGCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGT
ACCTCGGAATCTGCGACTCCGGAATCTGGCCCGGGCACGAGCACGGAGCCGT
CTGAGGGTAGCGCACCAGGTACCAGCACTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACC
GGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGGTACCTCCACTGAG
CCATCCGAGGGTTCAGCACCAGGTACTAGCACGGAACCGTCCGAGGGCTCTG
CACCAGGTACGAGCACCGAACCGTCGGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCCAGC
GGGCTCTCCGACAAGCACCGAAGAAGGCACCAGCACCGAGCCGTCCGAAGGT
TCCGCACCAGGTACAAGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCG
AGCCTGCAACCAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACTTCCGAATCTGCGACCCC
GGAGTCCGGTCCAGGTTCAGAGCCGGCGACGAGCGGTTCGGAAACGCCGGG
TACGTCTGAATCAGCCACGCCGGAGTCTGGTCCGGGTACCTCGACCGAACCAA
GCGAAGGTTCGGCACCGGGTACTAGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCC
GGGCAGCCCGGCAGGTTCTCCAACCAGCACCGAAGAAGGTTCCCCTGCTGGT
AGCCCGACCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCCAACTTCTACTGA

GGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCCAGAAAGCGGTCCTGGTACCTCCACTG
AACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACTTCTGAGTCTGCTACTCCAGAAAGC
GGCCCAGGTTCTGAACCAGCAACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGGCACTTCTGA
GTCCGCAACGCCTGAATCCGGTCCTGGTTCTGAACCAGCTACTTCCGGCAGCG
AAACCCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCCTGGTACTTCC
ACTGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACCAGGTTCTCCGGCTGGTAGCCCGACCA
GCACGGAGGAGGGTACGTCTGAATCTGCAACGCCGGAATCGGGCCCAGGTTC
GGAGCCTGCAACGTCTGGCAGCGAAACCCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACA
CCGGAAAGCGGTCCTGGCAGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGG
GTTCACCGGCAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCACGGAGCC
GAGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGAGAGCGG
TCCAGGCACCAGCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCCCAGGTACTTCACCC
TCTGCTACGCCGGAAAGCGGTCCGGGTTCCGAGCCGGCGACCAGCGGCTCCG
AGACTCCGGGTTCGGAGCCGGCGACCTCCGGCTCGGAAACCCCGGGTAGCCC
GGCTGGTTCTCCGACCAGCACTGAGGAAGGCACCAGCACCGAACCAAGCGAG
GGCAGCGCGCCAGGTACGAGCACCGAACCGAGCGAGGGTTCAGCCCCTGGC
TCTGAGCCGGCGACGTCTGGCTCCGAAACCCCGGGCACCAGCGAGAGCGCTG
GTGAACCGGAAGCG (SEQ ID NO: 9000).

Datos *in vitro*, incluyendo citotoxicidad, CRA *in vitro* y activación de células T

La citotoxicidad in vitro de los cabezas de serie de PSMA-paTCE se escrutó utilizando líneas celulares LNCaP o 22Rv1 a una proporción de Efector con respecto a Diana (E:T) de 10 a 1. Los cabezas de serie de PSMA-paTCE desenmascarados (PSMA-uTCE) tenían un valor de CE50 entre 1 pM y 100 pM en la línea celular LnCaP (véase la Tabla 24 a continuación). Los cabezas de serie de PSMA-paTCE desenmascarados

(PSMA-uTCE) tenían un valor de CE50 entre 1 pM y 2000 pM en la línea celular 22Rv1 (véase la Tabla 25 a continuación). Se han evaluado varias longitudes de conector entre los dominios TAA y CD3 en el ensayo de citotoxicidad *in vitro* utilizando la línea celular LNCaP que tiene una CE50 en el rango de 1 pM a 50 pM. Se escrutaron diferentes orientaciones de dominios CD3 pesados y ligeros que tenían una CE50 entre 1 pM y 50 pM. El PSMA-paTCE AMX-500 tiene una CE50 que oscila entre 35000 pM y 90000 pM en la línea celular LnCaP. El metabolito AMX-500(1x-N) de PSMA-paTCE AMX-500 tiene una CE50 que oscila entre 5000 pM y 8000 pM en la línea celular LnCaP. El metabolito AMX-500(1x-C) de PSMA-paTCE AMX-500 tiene una CE50 que oscila entre 6000 pM y 12000 pM en la línea celular LnCaP. El AMX-500 completamente desenmascarado (uTCE) tiene una CE50 que oscila entre 15 pM y 35 pM en la línea celular LnCaP. El PSMA-paTCE AMX-500, el AMX-500(1x-N) y el AMX-500(1x-C) no mostraron ninguna actividad citotóxica hasta 1 µM en la línea celular 22Rv1. AMX-500 completamente desenmascarado (uTCE) tiene una CE50 que oscila entre 600 pM y 1500 pM en la línea celular 22Rv1 (véanse las FIG. 11A - FIG. 11B para las curvas de dosis-respuesta).

Tabla 24 – Valores de CE50 del ensayo de citotoxicidad *in vitro* en la línea celular LnCaP

uTCE	uTCE	paTCE enmas-carado	uTCE	paTCE enmas-carado	uTCE	paTCE enmas-carado	uTCE	paTCE enmas-carado
PSMA.5-CD3.23	PSMA.119-CD3.23		PSMA.350-CD3.228		PSMA.350-CD3.23		PSMA.262-CD3.228	
AC3092	AC3445	AC3445	AC3896	AC3896	AC3928	AC3928	AC3934	AC3934
20 pM	22 pM	7,909 pM	49 pM	46,806 pM	43 pM	188,626 pM	3 pM	ND

Tabla 25 - Valores de CE50 del ensayo de citotoxicidad *in vitro* en la línea celular 22Rv1

uTCE	uTCE	paTCE enmas-carado	uTCE	paTCE enmas-carado	uTCE	paTCE enmas-carado	uTCE	paTCE enmas-carado
PSMA.5-CD3.23	PSMA.119-CD3.23		PSMA.350-CD3.228		PSMA.350-CD3.23		PSMA.262-CD3.228	
AC3092	AC3445	AC3445	AC3896	AC3896	AC3928	AC3928	AC3934	AC3934
18 pM	160 pM	6896 pM	523 pM	5640 pM	1294 pM	ND	34 pM	3753 pM

Se probaron longitudes variables de conector de aminoácidos entre el anticuerpo contra PSMA y el anticuerpo contra CD3 para determinar su efecto sobre la citotoxicidad *in vitro* en las líneas celulares LNCaP y 22Rv1. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 26. Las curvas dosis-respuesta para los Donantes A-C se muestran en la FIG. 12A-FIG. 12C.

Tabla 26: Valores de CI50 del ensayo de citotoxicidad *in vitro* en la línea celular LnCaP y la línea celular 22Rv1 con longitudes de conector alternativas

AC uTCE	Dominios	Conector	Orden de los domi-nios para CD3	Longitud de N_ELNN	Longitud de C_ELNN	Descripción	CI50 (pM) LNCaP-FGC Donante A	CI50 (pM) LNCaP-FGC Donante B	CI50 (pM) 22Rv1 Donante C
uTCE de AC2591	[PSMA.2]-[CD3.23]	9	VL-VH	288	576	Control, α-PSMA de Camélido inicial	5,1	5,2	146
uTCE de AC3092	[PSMA.5]-[CD3.23]	9	VL-VH	144	144	Control, α-PSMA Humanizado inicial	5,9	ND	418
uTCE de AC3353	[PSMA.5]-[CD3.23]	5	VL-VH	144	144	Pentámero GS VHH ScFv conector	ND	15	470
uTCE de AC3354	[PSMA.5]-[CD3.23]	15	VL-VH	144	144	Deca-pentámero ELNN VHH ScFv conector	ND	31	1,289

uTCE de AC3356	[PSMA.5]-[CD3.23]	9	VH-VL	144	144	intercambio de domino VH-VL cd3.23	20,1	29	1,350
uTCE de AC3329	[PSMA.119]-[CD3.23]	9	VL-VH	144	144	mutación L59K de PSMA.5, variante de eliminación de PTE	4,8	ND	532

Se recogieron los sobrenadantes de las células LNCaP después de las reacciones citotóxicas y se realizaron ensayos de citocinas *in vitro*. En general, la inducción de IL-6 e IL-10 mediante el cabeza de serie AMX-500 de PSMA-paTCE se redujo entre 100 y 1000 veces en comparación con el AMX-500 completamente desenmascarado (uTCE). Los metabolitos enmascarados individualmente AMX-500(1x-N) y AMX-500(1x-C) indujeron IL-6 e IL-10 de manera similar al AMX-500 completamente enmascarado. AMX-500 (uTCE) indujo la liberación de GM-CSF e IFN-g a niveles mucho más bajos que AMX-500. En general, los metabolitos enmascarados individualmente tuvieron una respuesta intermedia entre uTCE y AMX-500. AMX-500 y AMX-500-SinSitiodeEscisión indujeron GM-CSF e IFN-g mínimos. AMX-500 o AMX-500 (uTCE) tienen una inducción mínima de IL-2 e IL-4. El nivel máximo de MCP-1 producido por AMX-500 y los diversos metabolitos fueron los mismos ~9000 pg/ml.

Para evaluar la actividad de las células T, se cocultivaron AMX-500 o sus metabolitos con PBMC humanas sanas junto con células LNCaP. Se incubaron PBMC humanas del Donante 1 con titulaciones de metabolitos AMX-500 o en presencia de células LNCaP a 37 °C (PMBC: células LNCaP a 10:1). Después de 72 horas, las PBMC se analizaron mediante análisis de citometría de flujo. Específicamente, se interrogaron células T CD4 y CD8 para determinar la

expresión de CD69, CD25 y PD-1. Los resultados se representan en la FIG. 16 y la FIG. 17.

El ensayo de actividad de células T anterior se repitió en dos donantes adicionales (Donante 2 y Donante 3). Los resultados para el Donante 2 se muestran en la FIG. 18. Los resultados para el Donante 3 se muestran en la FIG. 19. Los valores de CE50 (nM) se resumen a continuación en la Tabla 27.

Tabla 27 - Valores de CE50 para la activación de células T en células T CD4+ y CD8+ según la expresión de CD69, CD25 y PD-1

Células T CD4	**AMX-500 [CE50, nM]**			**AMX-500 (uTCE) [CE50, nM]**		
ID Donante	**CD69**	**CD25**	**PD-1**	**CD69**	**CD25**	**PD-1**
Donante 1	N.D.	N.D.	N.D.	0,5726	0,8236	2,415
Donante 2	N.D.	N.D.	N.D.	1,888	0,4784	1,794
Donante 3	N.D.	N.D.	N.D.	0,9662	2,081	0,6407

Células T CD8	**AMX-500 [CE50, nM]**			**AMX-500(uTCE) [CE50, nM]**		
ID Donante	**CD69**	**CD25**	**PD-1**	**CD69**	**CD25**	**PD-1**
Donante 1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,5807	0,9478
Donante 2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,5592	4,386
Donante 3	N.D.	N.D.	N.D.	2,148	1,22	1,788

En resumen, el AMX-500 completamente enmascarado protegió contra la activación de las células T en comparación con el AMX-500 (uTCE). Los intermedios AMX-500 (1X-C, 1X-N) mantuvieron la protección con respecto a AMX-500 (uTCE); aunque en menor medida (en general) que AMX-500.

Tabla 28 – Citotoxicidad *in vitro* en células LNCaP PSMA^{alto} de 5 donantes diferentes. Valores referidos como CI50 (pM)

Donante	AMX-500 (uTCE)	AMX-500	AMX-500(1X-N)	AMX-500(1X-C)	AMX-500-SinSitiode-Escisión
1	24	42190	5377	8579	42005
2	15	44651	5709	6176	383235
3	16	37737	7893	6703	15188
4	ND*	38283	5359	12063	14893
5	32	85371	6439	6287	219590

* ND – no determinado

Como se muestra más arriba en la Tabla 28 y la FIG. 13A y la FIG. 13B, AMX-500 proporciona una protección ~2500 veces mayor en el ensayo de citotoxicidad *in vitro* en comparación con AMX-500 (uTCE). Por otra parte, los intermedios de escisión de AMX-500 (1x-N y 1x-C) mantienen la protección y reducen la citotoxicidad entre 200 y 500 veces con respecto a AMX-500 (uTCE). Finalmente, AMX-500(SinSitiodeEscisión) exhibió una citotoxicidad similar a AMX-500. AMX-500(SinSitiodeEscisión) corresponde a una versión de AMX-500 con polipéptidos de enmascaramiento que no son escindibles.

Se realizó un ensayo de liberación de citocinas in vitro utilizando células PBMC:LNCAP a una razón efector-diana de 10:1. Se midieron las citocinas INF-γ, TNF-α, IL-6, IL-10, GM-CSF, IL-1β, IL-2, IL-4 y MCP-1. Los resultados se representan en la FIG. 15 para 1 de 5 donantes (Donante 5). Se obtuvieron resultados similares de muestras de los Donantes 1-4.

En general, la inducción de IL-6 e IL-10 por AMX-500 se redujo entre 100 y 1000 veces, con respecto a AMX-500 (uTCE), y los metabolitos enmascarados individualmente indujeron IL-6 e IL-10 de manera similar a AMX-500.

AMX-500 (uTCE) indujo la liberación de GM-CSF e IFN-γ a niveles mucho más altos en comparación con AMX-500, y los metabolitos enmascarados individualmente tuvieron una respuesta intermedia entre uTCE y AMX-500. AMX-500 y AMX-500-SinSitiodeEscisión indujeron GM-CSF e IFN-γ mínimos.

AMX-500 (uTCE) indujo una respuesta de TNF-α e IL-1β a un nivel mucho más alto en comparación con AMX-500. Los metabolitos enmascarados individualmente indujeron niveles de TNF-α e IL-1β similares a los de AMX-500. AMX-500 y AMX-500-SinSitiodeEscisión produjeron niveles de mínimos a no medibles de TNF-α e IL-1β.

Se observó una inducción mínima de IL-2 e IL-4 con AMX-500 o AMX-500 (uTCE). El nivel máximo de MCP-1 producido por AMX-500 y los distintos formatos fue el mismo en ~9000 pg/ml.

Tabla 29 – Citotoxicidad *in vitro* en células 22Rv1 $PSMA^{alto}$ de 3 donantes diferentes. Valores referidos como CI50 (pM)

ID Donante	AMX-500 (uTCE)	AMX-500	AMX-500 (SinSitiodeEscisión)	AMX-500 (1X-N)	AMX-500 (1X-C)
1	691	ND	ND	ND	ND
2	1343	ND	ND	ND	ND
3	1298	ND	ND	ND	ND

* ND – no determinado

Como se muestra más arriba en la Tabla 29 y la FIG. 14A y la FIG. 14B, AMX-500 (uTCE) tiene una citotoxicidad reducida contra las células 22Rv1, que tienen una densidad de receptor de aproximadamente 4.000 copias de PSMA por célula, en comparación con las células LNCaP, que tienen una densidad de receptor de aproximadamente 209.000 copias de PSMA por célula.

Ensayo de unión inespecífica

La unión inespecífica de AMX-500 se midió frente a aproximadamente 6.000 proteínas de membrana diferentes en células HEK293T. La detección de la unión del ligando se realizó mediante FACS de inmunofluorescencia. Se consideró la validación de aciertos con señal >3 desviaciones típicas por encima del fondo. Como se muestra en la FIG. 20A y FIG. 20B, AMX-500 y AMX-500-P7 no se unen a ninguna de las 6000 dianas por encima del fondo aparte del PSMA, el complejo CD3 y el CD3 épsilon. Se determinó que la unión a FCGR1A era un artefacto de la unión del anticuerpo secundario.

Eficacia *in vivo* en ratones

Se evaluó PSMA-paTCE AMX-500 en tres modelos de xenoinjerto derivado de líneas celulares (CDX) *in vivo* que incluyen líneas celulares C4-2 ($PSMA^{alto}$, independiente de andrógenos), LNCaP-FGC ($PSMA^{alto}$) y 22Rv1 ($PSMA^{bajo/neg}$). AMX-500 exhibe inhibición del crecimiento tumoral a 3,5 mg/kg y 7,5 mg/kg dos veces por semana mediante inyección iv en el modelo C4-2. AMX-500 exhibe inhibición del crecimiento tumoral en 3 mg/kg dos veces o una vez por semana mediante inyección iv en el modelo LNCaP. AMX-500 (uTCE) exhibe inhibición del crecimiento tumoral a 0,35 mg/kg dos veces por semana mediante inyección iv en el modelo LNCaP. AMX-500 exhibe inhibición del crecimiento tumoral a 2 mg/kg dos veces por semana mediante inyección iv en el modelo 22Rv1. AMX-500(uTCE) exhibe inhibición del crecimiento tumoral a 0,35 mg/kg dos veces por semana mediante inyección iv en el modelo 22Rv1 (FIG. 21).

Se realizaron experimentos adicionales de eficacia *in vivo* con una variedad de dosis alternativas.

La eficacia *in vivo* de AMX 500, AMX 500SinSitiodeEscisión y AMX-500(uTCE) se evaluó en el modelo de tumor de próstata humano de colonias de rápido crecimiento (FGC) en LNCaP injertadas con PBMC humanas en ratones diabéticos no obesos (NOD).Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG).

Los ratones con tumores LNCaP FGC se distribuyeron aleatoriamente en 7 grupos de 8 ratones cada uno y se les administró diluyente de vehículo (sin PBMC), diluyente de vehículo (PBMC), 0,5 mg/kg de AMX 500, 1,5 mg/kg de AMX 500, 3 mg/kg de AMX 500, y 3 mg/kg de AMX 500-SinSitiodeEscisión en bolo IV semanal, y 3 mg/kg de AMX-500(uTCE) en bolo IV dos veces por semana. El AMX 500(uTCE) se administró dos veces por semana para tener en cuenta la eliminación más rápida esperada del TCE desenmascarado. El diseño experimental y el resumen de resultados se muestran en la Tabla 30. Las curvas de crecimiento tumoral entre el inicio del tratamiento (Día 8) y la finalización del estudio (Día 28) se muestran en la FIG. 22.

Todos los artículos de prueba fueron bien tolerados por los animales de experimentación, como lo demuestra la pérdida de peso corporal promedio (BWL) similar en el rango de 3 a 9 % en todos los grupos experimentales.

El tratamiento con AMX 500 promovió la actividad antitumoral a todos los niveles de dosis cuando se evaluó en comparación con el control injertado de PBMC aplicable, Grupo 2. El Día 30, al final del estudio, AMX 500 a un nivel de dosis de 3 mg/kg QW mostró una TGI de 75 % ($p<0,0001$), mientras que los niveles de dosis intermedios (1,5 mg/kg QW) y más bajos (0,5 mg/kg QW) mostraron TGI de 62 % ($p=0,0129$) y 64 % ($p=0,0149$), respectivamente. El día 30, el tratamiento con AMX 500 a la dosis más alta probada de 3 mg/kg QW tuvo una TGI similar (75 % de TGI) a la de AMX 500

(uTCE) (80 % de TGI) activado y escindido enzimáticamente utilizando una dosis de 0,35 mg/kg dos veces por semana (BIW). Puesto que las máscaras de AMX 500 solo reducen la unión y la actividad, AMX 500-SinSitiodeEscisión mostró una respuesta parcial en este modelo (52 % de TGI). Sin embargo, el AMX 500 activable por proteasa exhibió un mayor efecto antitumoral a una dosis de 0,5 mg/kg (64 % de TGI) que el observado con AMX 500-SinSitiodeEscisión a una dosis QW de 3 mg/kg (52 % de TGI), lo que indica que las máscaras ELNN de AMX 500 pueden eliminarse en el microambiente del tumor, liberando el potente TCE desenmascarado.

Tabla 30 - Diseño del estudio y resumen de resultados

Diseño del Estudio							**Resultados Día 30**		
Grupo	**N**	**Tratamiento**	**Nivel de Dosis (mg/kg)**	**Volumen de Dosificación (mL/kg)**	**Vía**	**Frecuencia y Duración de Dosificación**	**BWL**	**TGI**	**Regresión Tumor [b] (#/n)**
1	8	Diluyente de vehículo, sin PBMC	—	10	IV	QW × 3 semanas	7,5 %	—	0/8
2	8	Diluyente de vehículo, PBMC	—	10	IV	QW × 3 semanas	8,4 %	—	0/8
3	8	AMX-500	0,5	10	IV	QW × 3 semanas	6,5 %	64 %	2/8
4	8	AMX-500	1,5	10	IV	QW × 3 semanas	7,2 %	62 %	2/7
5	8	AMX-500	3,0	10	IV	QW × 3 semanas	3,7 %	75 %	4/8
6	8	AMX-500-Sin SitiodeEscisión	3,0	10	IV	QW × 3 semanas	8,6 %	52 %	2/8
7	8	AMX-500(uTCE)	0,35	10	IV	BIW × 3 semanas	8,2 %	80 %	1/8

Abreviaturas: BIW, 2 veces por semana; BWL: pérdida de peso corporal comparada con el peso corporal al inicio del tratamiento; IV, intravenosa; NA, no aplicable; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; QW, una vez por semana; TGI, inhibición del crecimiento tumoral.

[a] TGI (%) = (Vc-Vt)/(Vc-Vo)×100, donde Vc y Vt son el volumen del tumor medio de los grupos de control y tratado al final del estudio (respectivamente) y Vo es el volumen del tumor medio del grupo de control al inicio de la dosificación. Se calculó la TGI frente al Grupo 2 (diluyente de vehículo, PBMC).

[b] La regresión del tumor se definió como el volumen del tumor al final del estudio (Día 30), que es menor que el volumen del tumor inicial antes de la dosificación.

La eficacia *in vivo* de AMX 500 (uTCE) y AMX 500 se evaluó en el modelo de tumor de próstata humano 22Rv1 injertado con células pan T activadas *ex vivo* humanas en ratones NSG.

Los ratones con tumores 22Rv1 se asignaron al azar a 1 grupo de 10 y 5 grupos de 9 ratones cada uno y se les administró diluyente de vehículo (sin pan T), diluyente de vehículo (con pan T), 0,35 mg/kg de AMX 500 (uTCE), 0,5 mg/kg de AMX 500 (uTCE), 2 mg/kg de AMX 500 o 5 mg/kg de AMX 500 3 veces por semana durante 3 semanas mediante inyección iv en bolo en la vena lateral de la cola. El diseño experimental y el resumen de resultados se muestran en la Tabla 31. Las curvas de crecimiento tumoral entre el inicio del tratamiento (Día 8) y la finalización del estudio (Día 28) se muestran en la FIG. 23.

Todos los artículos de prueba fueron generalmente bien tolerados por los animales de prueba, como lo muestra el BWL promedio mínimo en el rango de 0,6 a 5,6 % en todos los grupos el Día 28.

AMX 500 (uTCE) y AMX 500 promovieron la actividad antitumoral a todos los niveles de dosis evaluados en comparación con el control injertado con pan T aplicable, Grupo 2. En el Día 28, los grupos de tratamiento tenían TGI en el rango de 47,4 a 63,7 %, lo que indica que AMX 500 tiene actividad en este modelo de tumor de ratón de baja expresión de PSMA.

Tabla 31 - Diseño del estudio y resumen de resultados

Diseño del Estudio							**Resultados Día 28**	
Grupo	**N**	**Tratamiento**	**Nivel de Dosis (mg/kg)**	**Volumen de Dosificación (mL/kg)**	**Ruta**	**Frecuencia de Dosificación y Duración**	**BWL**	**TGI**
1	10	Vehículo (no pan T)	NA	10	IV	TIW×3semanas	1,6 %	—

Diseño del Estudio							Resultados Día 28	
Grupo	**N**	**Tratamiento**	**Nivel de Dosis (mg/kg)**	**Volumen de Dosificación (mL/kg)**	**Ruta**	**Frecuencia de Dosificación y Duración**	**BWL**	**TGI**
2	9	Vehículo + pan T	NA	10	IV	TIW×3semanas	1,9 %	—
3	9	AMX-500(uTCE)	0,35	10	IV	TIW×3semanas	2,0 %	63,7 %
4	9	AMX-500(uTCE)	0,5	10	IV	TIW×3semanas	5,6 %	47,4 %
5	9	AMX-500	2	10	IV	TIW×3semanas	4,1 %	56,7 %
6	9	AMX-500	5	10	IV	TIW×3semanas	0,6 %	63,6 %

Abreviaturas: BWL = pérdida de peso corporal en comparación con el peso corporal al inicio del tratamiento; IV = intravenosa; TGI = inhibición del crecimiento tumoral; TIW = 3 veces por semana.

[a] TGI (%) = (Vc-Vt)/(Vc-Vo)×100, donde Vc y Vt son el volumen del tumor medio de los grupos control y tratado al final del estudio (respectivamente) y Vo es el volumen del tumor medio del grupo de control al inicio de la dosificación. La TGI se calculó frente al Grupo 2 (diluyente de vehículo + pan T).

Eficacia *in vivo* en ratones - Combinación de pembrolizumab

Además, se probó una combinación de AMX-500 y pembrolizumab en el modelo CDX LNCaP. Un tratamiento de 1,5 mg/kg de AMX-500 (inyección IV una vez por semana) junto con 10 mg/kg de pembrolizumab (inyección IV dos veces por semana) exhibe una actividad antitumoral mejorada hasta 90 % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) (FIG. 24).

Evaluación de la toxicidad *in vivo*

Se administró AMX-500 a monos cinomolgos. Los monos cinomolgos siguieron un programa de recuperación de 4 semanas para evaluar la reversibilidad de cualquier hallazgo. En general, AMX-500 es bien tolerado y no se observan hallazgos aparentes relacionados con el tratamiento, incluidos signos clínicos aparentes relacionados con el tratamiento, ningún cambio aparente relacionado con el tratamiento en la patología clínica, ningún hallazgo aparente relacionado con el tratamiento en los exámenes de oftalmología y ningún hallazgo aparente relacionado con el tratamiento en los exámenes de necropsia macroscópicos.

Distribución tumoral *in vivo* y escisión tumoral

Se determinaron la distribución del tejido tumoral y la escisión del polipéptido de enmascaramiento de AMX-500. A los ratones portadores de tumores se les administró AMX-500 marcado con fluorescencia. Se evaluaron múltiples modelos de tumores de xenoinjerto (LNCAP-FGC, 22RV1) y se recogieron tejidos y plasma seleccionados 48 horas después de la administración. Se añadió un paTCE de control durante la homogeneización de los tejidos. La abundancia relativa de AMX-500 y los productos de escisión se cuantificaron mediante SDS-PAGE y detección LI-COR. Como se muestra en la FIG. 26, AMX-500 se distribuyó al tejido sano y al tumor xenoinjertado dentro de las 48 horas posteriores a la administración. Como se muestra en la Tabla 32, se detectaron intermedios de escisión de AMX-500 y AMX-500 completamente desenmascarado en el xenoinjerto LNCaP-FGC. Se observó escisión mínima de AMX-500 en plasma o tejido sano. No se observó escisión de AMX-500 en el modelo de xenoinjerto 22Rv1 ni en modelos PDx adicionales (n=4).

Tabla 32 - Abundancia relativa de escisión *in vivo*

-	AMX-500	1X-N	1X-C	uTCE
Tumor	86,5 %	1,4 %	3,1 %	8,9 %
Cerebro	100 %	ND	ND	ND
Corazón	100 %	ND	ND	ND
Pulmón	99,4 %	ND	< 2 %	ND
Hígado	98,5 %	< 2 %	< 2 %	ND
Próstata	100 %	ND	ND	ND
Plasma	98,3 %	0,6 %	1,1 %	< 0,1 %

Si bien se han mostrado y descrito en el presente documento las modalidades de la presente invención, resultará obvio para los expertos en la técnica que tales modalidades se proporcionan únicamente a modo de ejemplo. No se pretende que la invención se limite a los ejemplos específicos proporcionados en la memoria descriptiva. Si bien la invención se ha descrito con referencia a la memoria descriptiva anteriormente mencionada, no se pretende que las descripciones e ilustraciones de las modalidades del presente documento sean consideradas en un sentido limitante. A los expertos en la técnica se les ocurrirán ahora numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Además, se entenderá que todos los aspectos de la invención no se limitan a las representaciones, configuraciones o proporciones relativas específicas expuestas en el presente documento que dependen una variedad de condiciones y variables. Se debe entender que se puede emplear diferentes alternativas a las modalidades de la invención descritas en el presente documento en la aplicación práctica de la invención. Por este motivo, se contempla que la invención también abarque cualquiera de tales alternativas, modificaciones, variaciones o equivalentes. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes queden cubiertos por las mismas.