

INMUNGLOBULINAS CONJUGADAS CON LISINA

SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud invoca prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/348.410, presentada el 10 de junio, 2016, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un Listado de secuencias presentada con la presente, y que se incorpora aquí por completo a modo de referencia.

CAMPO TÉCNICO

[0003] En la presente se proveen inmunoglobulinas conjugadas con lisina y métodos para crear las mismas.

ANTECEDENTES

[0004] La utilidad de los anticuerpos monoclonales abarca desde la investigación básica hasta aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. La capacidad para conjugar anticuerpos a agentes funcionales extiende aún más su funcionalidad. La elaboración de anticuerpos conjugados habitualmente comprende la conjugación de un conector, fármaco u otro agente funcional con residuos reactivos de lisina cisteína en las cadenas pesada (HC) y liviana (LC) de un anticuerpo monoclonal (mAb). Véase Deonarain, *et al.*, “Emerging formats for next-generation antibody drug conjugates”, *Expert Opinion in Drug Discovery* (2015), 10(5): 463-481. La conjugación con lisina típicamente esta mediada por una química basada en succinimida (NHS) o basada en isotiocianato. La conjugación basada en cisteína requiere una reducción parcial del anticuerpo para romper algunos de los enlaces disulfuro entre cadenas, creando de esa manera cadenas laterales tiol libres. Los agentes funcionales que reaccionan con tiol pueden reaccionar luego con los grupos tiol libres en el anticuerpo para generar conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC). Ambos métodos dan como resultado la modificación

de múltiples lisinas o cisteínas lo cual conduce a mezclas heterogéneas de ADC con una distribución de relaciones de fármaco a anticuerpo (DAR) y modificaciones de fármacos en posiciones aleatorias.

[0005] Un avance reciente para utilizar tecnologías de conjugación específicas del sitio como una manera para producir un producto ADC homogéneo con una DAR definida ha conducido a varios métodos que incluyen modificación de cisteínas no apareadas, incorporación de aminoácidos no naturales y modificación enzimática específica del sitio. Si bien estos métodos permiten producir productos homogéneos, cada uno presenta desventajas. La conjugación basada en cisteínas necesita un paso adicional para eliminar una cisteína protectora, glutatión o aún una cadena liviana de la cisteína no apareada. Véase, por ejemplo, Junutula, *et al.*, “Site-Specific Conjugation of a Cytotoxic Drug to an Antibody Improves Therapeutic Index”, *Nature Biotechnology*, (2008) 26: 925-932; Chen, *et al.*, “Charge-based Analysis of Antibodies with Engineered Cysteines”, *MAbs* (2009) 1(6): 563-571; Gomez, *et al.*, “Effect of temperature, pH, dissolved oxygen, and hydrolysate on the formation of triple light chain antibodies in cell culture”, *Biotechnol Progress* (2010), 26: 1438-1445. Además, se ha demostrado que la inestabilidad en suero de la química basada en maleimida utilizada actualmente para los conjugados basados en cisteína genera preocupaciones en cuanto a la pérdida potencia o a la toxicidad fuera del blanco. Alley, *et al.*, “Contribution of Linker Stability to the Activities of Anticancer Immunoconjugates”, *Bioconjugate Chemistry* (2008) 19(3): 759-765; Shen, *et al.*, “Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates”, *Nature Biotechnology* (2012) 30: 184-189. La incorporación de aminoácidos no naturales necesita la expresión ya sea en un sistema basado en células modificadas genética o libre de células. Hallam, *et al.*, “Unnatural Amino Acids in Novel Antibody Conjugates”, *Future Med. Chem.* (2014) 6(11): 1309-1324. Además, la presencia de un aminoácido no natural podría

desencadenar una respuesta inmunogénica en los pacientes. Sin embargo, las modificaciones enzimáticas específicas del sitio podrían utilizar potencialmente un aminoácido nativo, de tipo salvaje en la secuencia del anticuerpo, minimizando de esa manera la posibilidad de una inmunogenicidad. Además, los enlaces de postraducción formados típicamente por enzimas modificadoras de proteínas son muy estables.

[0006] La modificación enzimática de proteínas específica del sitio se ha explorado usando una familia de proteínas denominadas transglutaminasas que catalizan la formación de un enlace isopeptídico estable entre el grupo γ -carboxiamida (donante de acilo) de una glutamina y el grupo ϵ -amino (aceptor de acilo) de una lisina (véase la Figura 1) (véase, por ejemplo, Yokoyama, *et al.*, “Properties and Applications of Microbial Transglutaminase”, *Appl. Microbiol. Biotech.*, (2004) 64: 47-454; Strop, “Versatility of Microbial Transglutaminase”, *Bioconjugate Chemistry*, (2014) 25(5): 855-862; Kieliszek *et al.*, “Microbial Transglutaminase and its Application in the Food Industry”, *Folia Microbiol* (2014) 59: 241-250). Recientemente, varios grupos han explorado el uso de las transglutaminasas como un medio para producir ADC (véase, por ejemplo, Josten *et al.*, “Use of Microbial Transglutaminase for the Enzymatic Biotinylation of Antibodies”, *J. Immunol Methods*, (2000) 240: 47-54; Mindt *et al.*, “Modification of Different IgG1 Antibodies via Glutamine and Lysine Using Bacterial and Human Tissue Transglutaminase”, *Bioconjugate Chemistry* (2008) 19(1): 271-278); Jeger, *et al.*, “Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2010) 49: 9995-9997; Strop *et al.*, “Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates”, *Chem Biol* (2013) 20(2): 161-167; Dennler *et al.*, “Transglutaminase-Based Chemo-Enzymatic Conjugation Approach Yields Homogeneous Antibody-Drug Conjugates”, *Bioconjugate Chemistry* (2014) 25(3):

569-578; Siegmund, *et al.*, “Locked by Design: A Conformationally Constrained Transglutaminase Tag Enables Efficient Site-Specific Conjugation”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2015) 54(45): 13420-13424). Las transglutaminasas están presentes en organismos que varían en un rango desde bacterias hasta seres humanos que están relacionadas estructural y funcionalmente, aún así, cada una está involucrada en procesos celulares específicos. Se ha utilizado ampliamente una transglutaminasa microbiana (transglutaminasa microbiana) aislada de la bacteria *Streptomyces mobaraensis* en toda la industria alimenticia para entrecruzar proteínas entre sí para diversas aplicaciones. Además de su bajo costo de manufacturación, es una técnica de conjugación atractiva debido a su capacidad para funcionar bajo un amplio rango de condiciones de pH, sales y temperatura.

[0007] A pesar de más de dos décadas de investigación, no se ha podido definir claramente la especificidad de sustrato de la transglutaminasa microbiana. En general, suelen ser preferidas las glutaminas o lisinas sobre bucles expuestos con residuos hidrofóbicos o de carga positiva adyacentes. Véase, Taguchi *et al.*, “Substrate specificity analysis of microbial transglutaminase using proteinaceous protease inhibitors as natural model substrates”, *J. Biochem.*, (2000) 128: 415-425; Sugimura *et al.*, “Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* using a phage-displayed peptide library”, *Arch. Biochem. Biophys.*, (2008) 477: 379-383; Tagami *et al.*, “Substrate specificity of microbial transglutaminase as revealed by three-dimensional docking simulation and mutagenesis”, *Protein Eng. Des. Sel.*, (2009) 22: 747-752. Se ha encontrado que el contexto de la glutamina donante de acilo es más crítico que el de la lisina aceptora de acilo. Véase, por ejemplo, Ohtsuka *et al.*, “Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines”, *J. Agric. Food Chem.*, (2000) 48: 6230-6233; Ohtsuka *et al.*, “Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors”, *Biosci. Biotechnol.*

Biochem., (2000) 64: 2608-2613; Gundersen *et al.*, "Microbial transglutaminase displays broad acyl-acceptor substrate specificity", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (2013) 98: 219-230. En efecto, un sustrato donante de acilo mínimo requiere un grupo N-carboxibenciloxi (CBZ) N-terminal seguido por una glutamina y una glicina C-terminal (CBZ-L-glutaminilglicina o Z-Gln-Gly) mientras que el aceptor de acilo mínimo es amoníaco.

[0008] Debido a una menor especificidad por la amina aceptora de acilo de la transglutaminasa microbiana, hasta ahora la investigación se ha centrado fundamentalmente en la transamidación de los residuos glutamina del anticuerpo. Véase, Josten *et al.*, Mindt *et al.*, Jeger *et al.*, Strop *et al.*, Dennler *et al.*, y Siegmund *et al.*, a los cuales se hizo referencia antes. Contrario a un informe anterior (Josten *et al.*, 2000) donde se describe la biotinylación mediada por mTGasa de un anticuerpo usando sustratos aceptores de acilo, varios grupos han demostrado recientemente poca o ninguna modificación por la mTGasa de anticuerpos de tipo salvaje con los mismos sustratos o sustratos similares. Estos datos confirmaron que a pesar de la abundancia de las glutaminas expuestas a solvente, ninguna estaba en el contexto apropiado como para ser transamidada por la mTGasa (Mindt *et al.*, 2008; Jeger *et al.*, 2010; Strop *et al.*, 2013).

[0009] También se ha especulado que el uso de un sustrato basado en donantes de aminas para transamidar una lisina puede dar un producto de ADC heterogéneo debido a las múltiples lisinas reactivas sobre la superficie de una IgG (Josten *et al.*, 2000; Jeger *et al.*, 2010). La IgG humana está compuesta por un promedio de 80 lisinas, de los cuales se predice que un 80-90% están expuestas al solvente (Gautier *et al.*, "Lysine Conjugated Properties in Human IgGs Studied by Integrating High-Resolution Native Mass Spectrometry and Bottom-Up Proteomics", *Proteomics* (2015) 15(16): 2756-2765; no se muestran los datos), y el codón C-terminal de la IgG₁, IgG₂, IgG₃ y la IgG₄ es una lisina (Ellison *et al.*, *DNA* (1981) 1:

11-18; Ellison *et al.*, ("Ellison *et al.*, 2"), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, (1982) 79: 1984-1988; Ellison *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, (1982) 10: 4071-4079). Sin embargo, la IgG derivada de suero carece de la lisina (Wang *et al.*, *J. Immunol.* (1980) 125: 1048-1054; Edelman *et al.*, *Proc Natl Acad. Sci. USA* (1969) 63: 78-85; Frangione *et al.*, *Biochemistry* (1980) 19: 4304-4308; Pink *et al.*, *Biochem. J.* (1970) 117: 33-47). Lo mismo se ha observado para la IgD (White *et al.*, *Science* (1985) 228: 733-737; Lin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1981) 78: 504-508; Shinoda *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981) 78: 785-789). La expresión recombinante de la IgG1 en células HEK293 y CHO también da como resultado una proteína que carece de la Lys447 C-terminal (Ellison *et al.*; Harris *et al.*, *Eur. J. Biochem.* (1990) 194: 611-620; Harris, *J. Chromatogr. A* (1995) 705: 129-134; Dick *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, (2008) 100: 1132-1143).

[0010] Hasta la fecha, los especialistas en el arte consideraron que el uso de un sustrato basado en un donante de amina para transamidar una lisina podría dar un producto ADC heterogéneo debido a la pluralidad de lisinas reactivas sobre la superficie de una IgG (Josten *et al.*, y Jeger *et al.*) y, por consiguiente, se ha desalentado el uso de un sustrato basado en un donante de amina para transamidar residuos lisina en las inmunoglobulinas.

[0011] Por lo tanto, existe la necesidad de modificaciones enzimáticas específicas del sitio de las inmunoglobulinas para crear conjugados que tengan un índice de conjugación predecible. Esto permitirá la creación de ADC con una DAR relativamente homóloga.

RESUMEN

[0012] La presente invención sorprendentemente divulga que, aunque no se observó una modificación de las lisinas de inmunoglobulinas de tipo salvaje por una transglutaminasa microbiana, cuando se introdujo un residuo lisina modificado en la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, la

transglutaminasa microbiana pudo utilizar el residuo lisina modificado como un aceptor de acilo. Sorprendentemente, la conjugación del residuo lisina modificado usando una transglutaminasa microbiana condujo a la incorporación específica del sitio y predecible de agentes funcionales conjugados. Además, la manipulación de residuos lisinas introduciéndolos en la región constante tiene una amplia aplicabilidad para cualquier inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, independientemente de sus regiones variables y especificidad de unión.

[0013] En un aspecto, en la presente se divulga un método para generar una inmunoglobulina conjugada, donde dicho método comprende poner una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, en contacto con una transglutaminasa microbiana y un agente funcional que comprende un sustrato donante de acilo y en donde la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende un residuo lisina modificado, en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina, y en donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo sobre el agente funcional, generando de esa manera la inmunoglobulina conjugada.

[0014] En otro aspecto, en la presente se divulga un método para generar una inmunoglobulina conjugada, donde dicho método comprende i) poner una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, en contacto con una transglutaminasa microbiana y un sustrato donante de acilo, en donde la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende un residuo lisina modificado y en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina,

y en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina y un grupo reactivo, en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo, y ii) conjugar un agente funcional con el grupo reactivo del sustrato donante de acilo, en donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, generando de esa manera la inmunoglobulina conjugada. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una cadena pesada. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región constante de la cadena pesada. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una cadena liviana. En otra forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región constante de la cadena liviana. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una cadena liviana kappa. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región constante kappa de la cadena liviana. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una cadena liviana lambda. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región constante lambda de la cadena liviana. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región variable. En una forma de realización, el residuo lisina modificado no está presente en una región variable.

[0015] En una forma de realización, el grupo reactivo del sustrato donante de acilo se conjuga con el agente funcional mediante química click.

[0016] En una forma de realización, el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina se selecciona del grupo que consiste en: Treonina 135 (T135K), Serina 136 (S136K), Leucina 193 (L193K), Ácido aspártico 221 (D221K), Treonina 223 (T223K), Histidina 224 (H224K), Treonina 225 (T225K), Metionina 252 (M252K), Asparagina 297 (N297K) o Prolina 445 (P445K) sobre una

cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, Leucina 201 (L201K) o Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, o Ácido glutámico 213 (E213K) sobre una cadena liviana lambda de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, la cadena pesada (antes de la mutación) comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 18. En otra forma de realización, la cadena liviana kappa (antes de la mutación) comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 19. En otra forma de realización, la cadena liviana lambda (antes de la mutación) comprende una secuencia que se muestra como la SEQ ID N°: 20.

[0017] En una forma de realización, la cadena pesada comprende además un residuo de aminoácido que se ha agregado por su extremo C-terminal en la posición 448, y en donde dicho residuo de aminoácido no es prolina o un residuo de aminoácido ácido. En una forma de realización adicional, el residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal en la posición 448 es leucina.

[0018] En una forma de realización, la inserción del residuo lisina es de un residuo lisina que se ha insertado entre la Serina 191 y la Serina 192 o entre la Serina 192 y la Leucina 193 sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0019] En una forma de realización, la inmunoglobulina es un fragmento de unión al antígeno (Fab'), y en donde el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina se selecciona del grupo que consiste en: Ácido aspártico 221 (D221K), Treonina 223 (T223K), Histidina 224 (H224K), Treonina 225 (T225K), Prolina 228 (P228K), Prolina 230 (P230K) y Ácido glutámico 233 (E233K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma. En otra forma de realización, el Fab' comprende toda la región bisagra. En

otra forma de realización, el Fab' comprende una región bisagra truncada.

[0020] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende además un segundo residuo lisina modificado, en donde el segundo residuo lisina modificado es un segundo residuo lisina insertado o un segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el segundo residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo. En otra forma de realización, el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma. En otra forma de realización, el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Treonina 135 (T135K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es leucina 201 (L201K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma. En aún otra forma de realización, el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Treonina 135 (T135K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización adicional, la cadena pesada comprende además un residuo de

aminoácido que se ha agregado por su extremo C-terminal en la posición 448, y en donde dicho residuo de aminoácido no es prolina o un residuo de aminoácido ácido. En un aspecto adicional, el residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal en la posición 448 es leucina.

[0021] En una forma de realización, la inmunoglobulina comprende además un tercer residuo lisina modificado, en donde el tercer residuo lisina modificado es un tercer residuo lisina insertado o un tercer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el tercer residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Asparagina 297 (N297K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el tercer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el tercer residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0022] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende además un cuarto residuo lisina modificado, en donde el cuarto residuo lisina modificado es un cuarto residuo lisina insertado o un cuarto residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el cuarto residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo. En otra forma de realización, el primer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina

modificado es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Asparagina 297 (N297K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, el tercer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el tercer residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el cuarto residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un cuarto residuo lisina modificado es Prolina 445 (P445K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0023] En una forma de realización, el residuo de aminoácido después del residuo lisina modificado no es prolina o un residuo de aminoácido ácido. En otra forma de realización, el residuo de aminoácido antes del residuo lisina modificado no es un residuo de aminoácido ácido. En otra forma de realización, la mutación del residuo de aminoácido después del residuo lisina modificado en cualquier aminoácido distinto de prolina o un residuo de aminoácido ácido y la mutación del residuo de aminoácido antes del residuo lisina modificado en cualquier aminoácido distinto de un residuo de aminoácido ácido, proporciona la secuencia óptima para un sitio aceptor de acilo lisina modificado.

[0024] En una forma de realización, el residuo de aminoácido antes del residuo lisina modificado un residuo de aminoácido insertado no ácido, o un residuo de aminoácido ácido natural que se ha mutado en un residuo de aminoácido no ácido. En una forma de realización, el residuo de aminoácido después del residuo lisina modificado es un residuo de aminoácido insertado, en donde el residuo de aminoácido insertado es un residuo de aminoácido insertado no ácido y un residuo insertado que no es prolina, o un residuo de aminoácido ácido natural o un residuo prolina natural, que se ha mutado en un residuo de aminoácido no ácido y un residuo

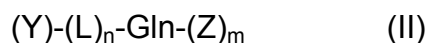
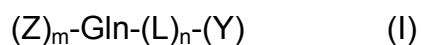
que no es prolina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido no ácido es lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano. En una forma de realización, el residuo de aminoácido no ácido insertado es una inserción de lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano. En una forma de realización, el aminoácido no ácido y el residuo que no es prolina es lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano. En una forma de realización, el residuo de aminoácido ácido natural es ácido aspártico o ácido glutámico.

[0025] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende una cadena pesada que comprende además por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado por su extremo C-terminal en la posición 448, y en donde dicho por lo menos un residuo de aminoácido no es prolina o un residuo de aminoácido ácido. En una forma de realización adicional, dicho por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal en la posición 448 es leucina.

[0026] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende una cadena liviana que comprende una inserción de uno a cuatro aminoácidos adicionales después de la cisteína 214, en donde la inserción del residuo lisina es un residuo lisina que se ha insertado después de dichos uno a cuatro aminoácidos adicionales, y en donde se ha insertado un residuo leucina después del residuo lisina. En una forma de realización adicional, la inserción de uno a cuatro aminoácidos adicionales después de la cisteína 214, el residuo lisina que se ha insertado después de dichos uno a cuatro aminoácidos adicionales y el residuo leucina que se ha insertado después del

residuo lisina comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: GKL, GGKL, GGSKL y GGSGKL. En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende una cadena liviana que comprende una inserción de la secuencia GGSGKL después de la cisteína 214.

[0027] En una forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la Fórmula (I) o (II):

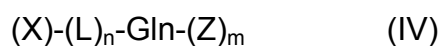
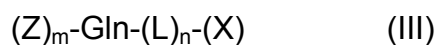


[0028] en donde Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido; Gln es un residuo de aminoácido glutamina; cada L es de manera independiente un conector de cadena lineal o ramificada de entre 1 y 20 átomos de carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono se puede reemplazar de manera opcional e independiente con un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y de nitrógeno puede estar sustituido opcionalmente; o cada L es de manera opcional e independiente un residuo de aminoácido; m es un número entero entre 0 y 5; n es un número entero entre 0 y 5; e Y es un agente funcional.

[0029] En una forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde L es una unidad de polietilenglicol (PEG) ($-\text{O}((\text{CH}_2)_2)-$), etilamina ($-\text{NH}((\text{CH}_2)_2)-$) o propilamina ($-\text{NH}((\text{CH}_2)_3)-$); y en donde n es 0, 1, 2 ó 3. En una forma de realización, L es una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, L comprende uno o más aminoácidos y una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), en donde Z es un grupo CBZ y en donde L es un aminoácido. En una forma de realización, L es Gly; m es 1; y n es 1. En otra forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante

de acilo es acorde con la fórmula (II), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 2, 3 ó 4; y por lo menos un grupo L es Gly; y por lo menos un grupo L es una unidad de PEG. En una forma de realización adicional, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (II), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 4; un grupo L es Gly y los tres grupos L remanentes son cada uno unidades de PEG. En otra forma de realización, el agente funcional Y es auristatina F.

[0030] En una forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la Fórmula (III) o (IV):

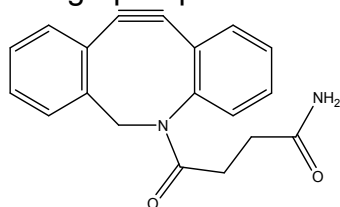


en donde Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido; Gln es un residuo de aminoácido glutamina; cada L es de manera independiente un conector de cadena lineal o ramificada de entre 1 y 20 átomos de carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono se puede reemplazar de manera opcional e independiente con un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y de nitrógeno puede estar sustituido opcionalmente; o cada L es de manera opcional e independiente un residuo de aminoácido; m es un número entero entre 0 y 5; n es un número entero entre 0 y 5; y X es un grupo reactivo.

[0031] En una forma de realización, L es una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, cuando n es 2-5, por lo menos un grupo L comprende uno o más aminoácidos y otro L es una unidad de polietilenglicol (PEG). En una forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde L es una unidad de polietilenglicol (PEG) (-O((CH₂)₂)-), etilamina (-NH((CH₂)₂)-) o propilamina (-NH((CH₂)₃)-); y en donde n es 0, 1, 2 ó 3. En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), en donde Z es un grupo CBZ, y en donde L es un

aminoácido. En una forma de realización, L es Gly; n es 1; y m es 1. En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (IV), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un grupo L es Gly.

[0032] En una forma de realización, X es un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en (1R,8S,9s)-biciclo[6,1,0]non-4-en-9-ilmetanol (BCN),



(dibenzocicloootina; DBCO), trans-cicloocteno (TCO), azido (N_3), alquino, tetrazinmetilciclopropeno, norborneno, hidrazida/hidrazina y aldehído.

[0033] En una forma de realización, el agente terapéutico es un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo, un agente quimioterapéutico, un agente farmacéutico, un agente radioactivo, un agente citotóxico, un antibiótico, una molécula pequeña, un ácido nucleico o un polipéptido. En otra forma de realización, el agente de diagnóstico es un fluoróforo, un colorante fluorescente, un radionúclido o una enzima.

[0034] En una forma de realización, la transglutaminasa microbiana es de *Streptomyces mobaraensis*.

[0035] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgG₁, o una porción de unión al antígeno de la misma. En otra forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgG₂, IgG₃ o IgG₄, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina IgA₁, IgA₂ o IgM. En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgD o IgE, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0036] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de

unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina humana, o una porción de unión al antígeno de la misma, o una inmunoglobulina humanizada, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina no humana, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0037] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. En una forma de realización, no hay un entrecruzamiento intramolecular, es decir, no hay uno o más enlaces disulfuro, entre las dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0038] En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es de entre 1:1 y 200:1 o entre 1:1 y 100:1.

[0039] En otro aspecto, en la presente se describe una inmunoglobulina conjugada que comprende una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y un agente funcional, en donde la inmunoglobulina comprende un residuo lisina modificado y en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, el agente funcional comprende un sustrato donante de acilo, en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina, y el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, en donde el residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, está conjugado con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo del agente funcional. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una cadena pesada. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región constante de la cadena pesada. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una cadena liviana. En

otra forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región constante de la cadena liviana. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una cadena liviana kappa. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región constante kappa de la cadena liviana. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una cadena liviana lambda. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región constante lambda de la cadena liviana. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región variable. En una forma de realización, el residuo lisina modificado no está presente en una región variable.

[0040] En otro aspecto, en la presente se describe una inmunoglobulina conjugada que comprende una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y un agente funcional, en donde la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende un residuo lisina modificado y en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, donde el residuo lisina modificado está conjugado con un residuo glutamina sobre un sustrato donante de acilo, en donde el sustrato donante de acilo comprende además un grupo reactivo, donde dicho grupo reactivo está conjugado con un agente funcional, en donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una cadena pesada. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región constante de la cadena pesada. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una cadena liviana. En otra forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región constante de la cadena liviana. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una cadena liviana kappa. En una forma de realización, el residuo lisina modificado

está presente en una región constante kappa de la cadena liviana. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una cadena liviana lambda. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región constante lambda de la cadena liviana. En una forma de realización, el residuo lisina modificado está presente en una región variable. En una forma de realización, el residuo lisina modificado no está presente en una región variable.

[0041] En una forma de realización, el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina se selecciona del grupo que consiste en: Treonina 135 (T135K), Serina 136 (S136K), Leucina 193 (L193K), Ácido aspártico 221 (D221K), Treonina 223 (T223K), Histidina 224 (H224K), Treonina 225 (T225K), Metionina 252 (M252K), Asparagina 297 (N297K) o Prolina 445 (P445K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, Leucina 201 (L201K) o Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, o Ácido glutámico 213 (E213K) sobre una cadena liviana lambda de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, la cadena pesada (antes de la mutación) comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 18. En una forma de realización, la cadena liviana kappa (antes de la mutación) comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 19. En una forma de realización, la cadena liviana lambda (antes de la mutación) comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 20.

[0042] En una forma de realización, la cadena pesada comprende además un residuo de aminoácido que se ha agregado por su extremo C-terminal en la posición 448, y en donde dicho residuo de aminoácido no es prolina o un residuo de aminoácido ácido. En una forma de realización adicional, dicho por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal en la posición 448 es leucina.

[0043] En otra forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende una cadena liviana que comprende por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal después de la posición 214, en donde dicho por lo menos un residuo de aminoácido es GGSGKL (glicina glicina serina glicina lisina leucina). En otra forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende una cadena liviana que comprende además por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal después de la posición 214, en donde dicho por lo menos un residuo de aminoácido es GGSGKL. En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende una cadena liviana que comprende una inserción de la secuencia GGSGKL después de la cisteína 214.

[0044] En una forma de realización, la inserción del residuo lisina es de un residuo lisina que se ha insertado entre la Serina 191 y la Serina 192 o entre la Serina 192 y la Leucina 193 sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0045] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es un fragmento de unión al antígeno (Fab), y en donde el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina se selecciona del grupo que consiste en: Ácido aspártico 221 (D221K), Treonina 223 (T223K), Histidina 224 (H224K), Treonina 225 (T225K), Prolina 228 (P228K), Prolina 230 (P230K) y Ácido glutámico 233 (E233K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma. En otra forma de realización, el Fab comprende toda la región bisagra. En otra forma de realización, el Fab comprende una región bisagra truncada.

[0046] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende además un segundo residuo de

aminoácido natural que se ha mutado en un segundo residuo lisina, y en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el segundo residuo lisina de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo. En otra forma de realización, el primer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina es Serina 202 (S202K). En otra forma de realización, el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Treonina 135 (T135K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es leucina 201 (L201K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma. En aún otra forma de realización, el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Treonina 135 (T135K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0047] En una forma de realización adicional, la cadena pesada comprende además por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado por su extremo C-terminal en la posición 448, y en donde dicho por lo menos un residuo de aminoácido no es prolina o un residuo de aminoácido ácido. En una forma de realización, dicho por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal en la posición 448 es leucina.

[0048] En una forma de realización, la inmunoglobulina comprende

además un tercer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un tercer residuo lisina, y en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el tercer residuo lisina de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo. En otra forma de realización, el primer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina es Asparagina 297 (N297K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el tercer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el tercer residuo lisina es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0049] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende además un cuarto residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un cuarto residuo lisina, y en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el cuarto residuo lisina de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo. En otra forma de realización, el primer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina es Asparagina 297 (N297K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, el tercer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el tercer residuo lisina es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el cuarto residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un cuarto residuo lisina es Prolina 445 (P445K) sobre una cadena pesada de la

inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0050] En una forma de realización, el residuo de aminoácido después del residuo lisina modificado no es prolina o un residuo de aminoácido ácido. En otra forma de realización, el residuo de aminoácido antes del residuo lisina modificado no es un residuo de aminoácido ácido. En otra forma de realización, la mutación del residuo de aminoácido después del residuo lisina modificado en cualquier aminoácido distinto de prolina o un residuo de aminoácido ácido y la mutación del residuo de aminoácido antes del residuo lisina modificado en cualquier aminoácido distinto de un residuo de aminoácido ácido, proporciona la secuencia óptima para un sitio aceptor de acilo lisina modificado.

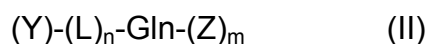
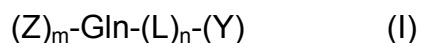
[0051] En una forma de realización, el residuo de aminoácido antes del residuo lisina modificado un residuo de aminoácido insertado no ácido, o un residuo de aminoácido ácido natural que se ha mutado en un residuo de aminoácido no ácido. En una forma de realización, el residuo de aminoácido después del residuo lisina modificado es un residuo de aminoácido insertado, en donde el residuo de aminoácido insertado es un residuo de aminoácido no ácido y un residuo insertado que no es prolina, o un residuo de aminoácido ácido natural o un residuo prolina natural, que se ha mutado en un residuo de aminoácido no ácido y un residuo que no es prolina. En una forma de realización adicional, el residuo de aminoácido no ácido es lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano. En otra forma de realización adicional, el residuo de aminoácido no ácido insertado es una inserción de lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano. En aún otra forma de realización adicional, el aminoácido no ácido y el residuo que no es prolina es lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, alanina, valina,

isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano. En aún otra forma de realización adicional, el residuo de aminoácido ácido natural es ácido aspártico o ácido glutámico.

[0052] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende una cadena pesada que comprende además por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado por su extremo C-terminal en la posición 448, y en donde dicho por lo menos un residuo de aminoácido no es prolina o un residuo de aminoácido ácido. En una forma de realización adicional, dicho por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal en la posición 448 es leucina.

[0053] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende una cadena liviana que comprende una inserción de uno a cuatro aminoácidos adicionales después de la cisteína 214, en donde la inserción del residuo lisina es un residuo lisina que se ha insertado después de dichos uno a cuatro aminoácidos adicionales, y en donde se ha insertado un residuo leucina después del residuo lisina. En una forma de realización adicional, la inserción de uno a cuatro aminoácidos adicionales después de la cisteína 214, el residuo lisina que se ha insertado después dichos uno a cuatro aminoácidos adicionales y el residuo leucina que se ha insertado después del residuo lisina comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: GKL, GGKL, GSKL, y GGSGKL.

[0054] En una forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la Fórmula (I) o (II):

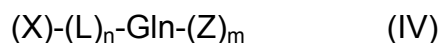
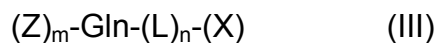


[0055] en donde Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido; Gln es un residuo de aminoácido glutamina; cada L es de manera

independiente un conector de cadena lineal o ramificada de entre 1 y 20 átomos de carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono se puede reemplazar de manera opcional e independiente con un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y de nitrógeno puede estar sustituido opcionalmente; o cada L es de manera opcional e independiente un residuo de aminoácido; m es un número entero entre 0 y 5; n es un número entero entre 0 y 5; e Y es un agente funcional.

[0056] En una forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde L es una unidad de polietilenglicol (PEG) ($-\text{O}((\text{CH}_2)_2)-$), etilamina ($-\text{NH}((\text{CH}_2)_2)-$) o propilamina ($-\text{NH}((\text{CH}_2)_3)-$); y en donde n es 0, 1, 2 ó 3. En otra forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), en donde Z es un grupo CBZ y en donde L es un aminoácido. En una forma de realización, L es Gly; m es 1; y n es 1. En una forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (II), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un grupo L es Gly. En una forma de realización, L es una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, L comprende uno o más aminoácidos y una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, el agente funcional Y es auristatina F.

[0057] En una forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la Fórmula (III) o (IV):

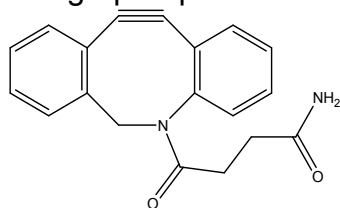


[0058] en donde Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido; Gln es un residuo de aminoácido glutamina; cada L es de manera independiente un conector de cadena lineal o ramificada de entre 1 y 20 átomos de

carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono se puede reemplazar de manera opcional e independiente con un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y de nitrógeno puede estar sustituido opcionalmente; o cada L es de manera opcional e independiente un residuo de aminoácido; m es un número entero entre 0 y 5; n es un número entero entre 0 y 5; y X es un grupo reactivo.

[0059] En una forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde L es una unidad de polietilenglicol (PEG) ($-O((CH_2)_2)-$), etilamina ($-NH((CH_2)_2)-$) o propilamina ($-NH((CH_2)_3)-$); y en donde n es 0, 1, 2 ó 3. En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), en donde Z es un grupo CBZ, y en donde L es un aminoácido. En una forma de realización, L es Gly; m es 1; y n es 1. En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (IV), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un grupo L es Gly. En una forma de realización, L es una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, cuando n es 2-5, entonces por lo menos un grupo L comprende uno o más aminoácidos y uno o más L comprenden una unidad de polietilenglicol (PEG).

[0060] En una forma de realización, X es un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en (1R,8S,9s)-biciclo[6,1,0]non-4-en-9-ilmetanol (BCN),



(dibenzociclooctina; DBCO), trans-cicloocteno (TCO),

azido (N_3), alquino, tetrazinmetilciclopropeno, norborneno, hidrazida/hidrazina y aldehído.

[0061] En una forma de realización, el agente terapéutico es un anticuerpo

o una porción de unión al antígeno del mismo, un agente quimioterapéutico, un agente farmacéutico, un agente radioactivo, un agente citotóxico, un antibiótico, una molécula pequeña, un ácido nucleico o un polipéptido. En otra forma de realización, el agente de diagnóstico es un fluoróforo, un colorante fluorescente, un radionúclido o una enzima.

[0062] En una forma de realización, la transglutaminasa microbiana es de *Streptomyces mobaraensis*.

[0063] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma es una inmunoglobulina IgG₁, o una porción de unión al antígeno de la misma. En otra forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgG₂, IgG₃ o IgG₄, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgA₁, IgA₂ o IgM, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgD o IgE, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0064] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina humana, o una porción de unión al antígeno de la misma, o una inmunoglobulina humanizada, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina no humana, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0065] En una forma de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. En una forma de realización, no hay un entrecruzamiento intramolecular entre las dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina, o una porción de unión al

antígeno de la misma.

[0066] En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es de entre 1:1 y 200:1 o entre 1:1 y 100:1.

[0067] En una forma de realización, el agente funcional es un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, y en donde la inmunoglobulina y el agente funcional se unen al mismo antígeno o se unen a antígenos diferentes.

[0068] En otro aspecto, en la presente se describe un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina conjugable. En otro aspecto, en la presente se describe un plásmido que comprende un ácido nucleico. En otra forma de realización, en la presente se describe una célula aislada que comprende un plásmido.

[0069] En otro aspecto, en la presente se describe una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina conjugada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0070] En un aspecto, en la presente se describe una inmunoglobulina conjugada producida mediante cualquiera de los métodos que se describen en la presente. En una forma de realización, el método además comprende un paso de purificar la inmunoglobulina conjugada con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo antes de conjugar el agente funcional con el grupo reactivo del sustrato donante de acilo. En una forma de realización, el paso de purificación comprende métodos basados en el tamaño, tales como cromatografía o diafiltración. En otra forma de realización, el paso de purificación incluye una separación basada en la carga, tal como cromatografía de intercambio aniónico o de intercambio catiónico. En otra forma de realización, el paso de purificación comprende un paso basado en la afinidad, tal como cromatografía con la Proteína A o la Proteína G y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0071] El resumen, así como la siguiente descripción detallada, se comprenderá mejor si se lee junto con las figuras adjuntas. A los efectos de ilustrar los métodos, y las inmunoglobulinas conjugadas, divulgados en las figuras se muestran ejemplos de formas de realización; sin embargo, los métodos y las inmunoglobulinas conjugadas no se limitan a las formas de realización específicas divulgadas. En las Figuras:

[0072] En la Figura 1 se muestra una reacción de una transglutaminasa, en donde la transglutaminasa cataliza la formación de un enlace isopeptídico entre una glutamina donante de acilo y una lisina aceptora de acilo con liberación de una molécula de amoníaco.

[0073] En la Figura 2 se muestran las estructuras de ejemplos de sustratos donantes de acilo Z-Gln-Gly.

[0074] En la Figura 3 se muestran posibles rutas para sintetizar los ejemplos de sustratos donantes de acilo Z-Gln-Gly.

[0075] En las Figuras 4A, 4B y 4C se muestran lisinas expuestas al solvente (representación de varas) en las estructuras cristalinas Fab y Fc de la IgG₁ humanas; (Figura 4A) VH-CH1 y Vκ-Cκ de Fab, (Figura 4B) VH-CH1 y Vλ-Cλ de Fab y (Figura 4C) CH2 y CH3 de Fc que se determinaron usando Discovery Studio 4.5 con un radio de sonda de 1,4 Å.

[0076] En las Figuras 5A, 5B, 5C, 5D, 5E y 5F, se muestra un análisis con ESI-MS de los anticuerpos en contacto con un donante de acilo y una transglutaminasa microbiana. Los anticuerpos se pusieron en contacto con un exceso molar 50X de Z-Gln-Gly-CAD-biotina y 1 U/ml de transglutaminasa microbiana durante la noche a 37 °C. Después de una digestión con IdeS y reducción, se determinaron las masas de LC, Fd y Fc mediante ESI-MS.

[0077] En la Figura 6 se muestran las secuencias de los dominios

constantes kappa y lambda de la IgG₁ humana. Las lisinas del dominio constante expuestas al solvente basado en las estructuras cristalinas de 1FC1 (Fcγ), 4F3F (CH1 y Cκ) y 4HK0 (Cλ) están resaltadas; las lisinas en los bucles están subrayadas. Los dominios constantes se numeran de acuerdo con el sistema de numeración EU.

[0078] En la Figura 7 se muestran los niveles de conjugación de mAb de CH1 y de bisagra mutantes purificados seleccionados para la transamidación mediante incubación de mTGasa con Z-Gln-Gly-CAD-biotina durante la noche a 37 °C. Los mAb biotinilados se detectaron mediante un ELISA como se detalla en Materiales y Métodos y se analizaron las unidades fluorescentes relativas (RFU). Se analizaron las masas de HC y LC mediante ESI-MS (no se muestran los datos) y se determinó el porcentaje de conjugación.

[0079] En la Figura 8 se muestran los niveles de conjugación de los mAb de CH1, CH2, CH3 y bisagra mutantes identificados previamente por tener la eficacia de conjugación más alta. Los mAb se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una mTGasa durante la noche a 37 °C. Las muestras se digirieron con IdeS, se redujeron y se analizaron mediante ESI-MS, y se determinó el porcentaje de conjugación con Z-Gln-Gly-CAD-biotina (Δ masa = 631 Da). La DAR se determinó dividiendo la Δ masa por la masa de Z-Gln-Gly-CAD-biotina

[0080] En la Figura 9 se muestra la eficacia de conjugación de los mAb con múltiples sitios aceptores de acilo con varios donantes de acilo. Los mAb se incubaron con Z-Gln-Gly-N₃, Z-Gln-Gly-PEG2-BCN o Z-Gln-Gly-PEG2-AuF y mTGasa a 37 °C durante la noche. Las masas de las LC reducidas se analizaron mediante LC-MS (no se muestran los datos) y se determinó el porcentaje de conjugación con Z-Gln-Gly-CAD-biotina (Δ masa = 631 Da).

[0081] En la Figura 10 se muestra el alineamiento de isotipos de Fc de IgG. Las secuencias de aminoácidos primarias de los Fc de las IgG1, 2, 3 y 4 humanas se alinean y se resaltan las diferencias. Los residuos Met252, Asn297 y Pro445 de

la IgG1 están indicados con una X.

[0082] En la Figura 11 se muestran Fab' con un aceptor de acilo que fueron conjugados con los sitios donantes de acilo Q295 y/o Q297 en el mAb mutante. El anticuerpo 01-N297Q se incubó con mutantes de lisina de Fab' y mTGasa durante la noche a 37 °C. Las muestras se redujeron y se analizaron mediante SDS-PAGE usando un gel de bis-Tris poliacrilamida al 4-12%. La masa del dímero FabCH1-HC es de aproximadamente 75 kDa y del trímero FabCH1-HC-FabCH1 es de aproximadamente 100 kDa.

[0083] En la Figura 12 se ilustran sitios aceptores de acilo modificado ubicado por todo el mAb. Las ubicaciones de residuos modificados con los sitios aceptores de acilo están resaltadas en (A) Fab (4F3F) HC y LC y (B) Fc (1FC1).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0084] Los métodos y las inmunoglobulinas conjugadas que se divulgan se comprenderán más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada junto con las figuras adjuntas, que forman parte de esta divulgación. Se comprenderá que los métodos y las inmunoglobulinas conjugadas que se divulgan no se limitan a las formas de realización específicas que se describen y/o muestran en la presente, y que la terminología usada en la presente sirve para describir las formas de realización particulares a modo de ejemplo solamente y no pretende limitar los métodos o inmunoglobulinas conjugadas reivindicadas.

[0085] A menos que específicamente se defina de otra manera, cualquier descripción de un posible mecanismo o modo de acción o razón de mejora solamente se ofrece a efectos ilustrativos, y los métodos y las inmunoglobulinas conjugadas que se divulgan no se verán restringidos por la precisión o falta de la misma de cualquiera de dichos mecanismos o modos de acción o razones de mejora sugeridos.

[0086] En todo este texto, las descripciones se refieren a inmunoglobulinas

conjugadas y a los métodos para generar las mismas. Cuando la divulgación describe o reivindica una característica o forma de realización asociada con una inmunoglobulina conjugada, dicha característica o forma de realización es igualmente aplicable a los métodos para generar las mismas. Asimismo, donde la divulgación describe o reivindica una característica o forma de realización asociada con un método para generar una inmunoglobulina conjugada, dicha característica o forma de realización es aplicable igualmente a la inmunoglobulina conjugada.

[0087] La referencia a un valor numérico particular incluye por lo menos dicho valor particular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Cuando se expresa un rango de valores, otra forma de realización incluye entre dicho un valor particular y/o el otro valor particular. Además, la referencia a los valores definidos en rangos incluyen cada uno y todos los valores incluidos en dicho rango. Todos los rangos son inclusivos y combinables.

[0088] Cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del término "aproximadamente" precedente, se comprenderá que dicho valor específico constituye otra forma de realización.

[0089] Se podrá apreciar que algunas características de los métodos y las inmunoglobulinas conjugadas divulgadas se describen en la presente, a efectos de una mayor claridad, en el contexto de formas de realización separadas, también se pueden proveer combinadas en una única forma de realización. Del mismo modo, varias características de los métodos e inmunoglobulinas conjugadas que, por razones de brevedad, se describen en el contexto de una única forma de realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación.

[0090] Según se usa en la presente, las formas en singular "un", "una", "el" y "la " incluyen las formas en plural.

[0091] En toda la Descripción y en las reivindicaciones se utilizarán diversos términos relacionados con los aspectos de la divulgación. Dichos términos

tendrán el significado que habitualmente tienen en el arte, a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente se interpretarán de una manera coherente con las definiciones provistas en la presente.

[0092] El término “aproximadamente”, cuando se usa con referencia a rangos numéricos, valores de corte o valores específicos, se usa para indicar que los valores indicados pueden variar hasta tanto como un 10% con respecto al valor enumerado. Por consiguiente, el término “aproximadamente” se usa para abarcar variaciones de $\pm 10\%$ o menos, variaciones de $\pm 5\%$ o menos, variaciones de $\pm 1\%$ o menos, variaciones de $\pm 0,5\%$ o menos o variaciones de $\pm 0,1\%$ o menos con respecto al valor especificado.

[0093] En general, el término “modificado” se refiere a la manipulación de moléculas de ácidos nucleicos o de polipéptidos con medios de síntesis (por ejemplo, mediante técnicas recombinantes, síntesis de péptidos *in vitro*, mediante acoplamiento enzimático o químico de péptidos, o mediante otros métodos usados comúnmente en el arte).

[0094] Según se usa en la presente, el término “residuo de aminoácido modificado” se refiere a un residuo de aminoácido no natural en el contexto de una secuencia. Según se usa en la presente, el término “residuo de ácido nucleico modificado” se refiere a un residuo de ácido nucleico no natural en el contexto de una secuencia. Estos términos incluyen, por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o una secuencia de ácidos nucleicos que comprende uno o más cambios de aminoácidos o de nucleótidos, incluyendo adiciones, supresiones o sustituciones, con relación a la correspondiente secuencia de polipéptidos natural o secuencia de ácidos nucleicos natural, en donde dichos cambios se introdujeron mediante técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, un “residuo lisina modificado” es un residuo lisina que no existe en la correspondiente secuencia de polipéptidos natural, o de tipo salvaje, y que se introdujo en el polipéptido, ya sea

mediante mutación de un residuo de aminoácido existente o mediante la inserción de un residuo lisina, cuando se alinean secuencias de las versiones de tipo salvaje y modificadas. Un residuo de aminoácido modificado no es un residuo de aminoácido sintético. Por ejemplo, un residuo lisina modificado no es un residuo lisina sintético.

[0095] En una forma de realización, un “residuo de aminoácido modificado” es un residuo de aminoácido insertado. Por ejemplo, se puede insertar uno o más residuos de aminoácidos entre dos residuos de aminoácidos naturales. En otra forma de realización, un “residuo de aminoácido modificado” es un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo de aminoácido diferente. Por ejemplo, un residuo lisina modificado puede ser un residuo de aminoácido natural (por ejemplo, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, serina o tirosina) que ha sido mutado, por ejemplo, usando técnicas de recombinación de ADN, en un residuo lisina. Los especialistas en el arte pueden generar fácilmente una secuencia de polipéptidos modificados que es de utilidad de acuerdo con este aspecto de la invención. Las secuencias de polipéptidos modificados se pueden producir mediante cualquier medio, que incluye, por ejemplo, síntesis de péptidos, polipéptidos o proteínas.

[0096] Según se usa en la presente, el término “inserción” o “adición” se refiere a un cambio en una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que resulta en la adición de uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, en comparación con la molécula natural (por ejemplo, la secuencia de tipo salvaje). La inserción o adición de uno o más residuos de aminoácidos puede tener lugar entre residuos de aminoácidos internos. Como alternativa, la inserción se puede efectuar por el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos. Como alternativa, la inserción se puede efectuar por el extremo C-terminal de la secuencia

de aminoácidos.

[0097] El término “aminoácido natural”, “residuo de aminoácido natural”, “aminoácido de origen natural” o “residuo de aminoácido de origen natural” se refiere a los aminoácidos naturales típicamente se encuentran en el contexto de una secuencia de polipéptidos de tipo salvaje. En otras palabras, un “aminoácido natural” no se ha mutado o cambiado de ninguna manera para que difiera del residuo de aminoácido presente en la secuencia parental, por ejemplo, la secuencia de origen natural. Un “aminoácido natural” incluye los aminoácidos en cualquier posición dentro de la secuencia de polipéptidos (por ejemplo, residuos de aminoácidos internos) y también cualquier aminoácido en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal de la secuencia de polipéptidos.

[0098] El término “sustrato donante de acilo” se refiere a un grupo que tiene un grupo acilo terminal. Preferiblemente, el “sustrato donante de acilo” comprende un residuo glutamina. Un sustrato donante de acilo puede contener opcionalmente otro grupo reactivo. En una primera forma de realización, el sustrato donante de acilo está conectado de manera covalente a un agente funcional. En una segunda forma de realización, el sustrato donante de acilo no está conectado a un agente funcional. En una forma de realización, el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina y un grupo reactivo. En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo comprende uno o más conectores, como se describirá con más detalle en la presente. En cualquiera de las formas de realización precedentes, opcionalmente hay un conector entre el sustrato donante de acilo y el agente funcional o entre el sustrato donante de acilo y el grupo reactivo.

[0099] El término “anticuerpo”, según se usa en la presente, se refiere en un sentido general a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L). El término “anticuerpo”, según se usa en la presente, también se refiere a

cualquier porción de unión al antígeno, mutante, variante o derivado de una molécula de inmunoglobulina, que retiene las características esenciales de unión al epítopo de una molécula de Ig. Estos formatos de anticuerpos mutantes, variantes o derivados son conocidos en la técnica y en la presente se describirán formas de realización no limitantes de los mismos. En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo no humano.

[00100] En un anticuerpo completo, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada como HCVR o VH en la presente) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de la cadena liviana (abreviada como LCVR o VL en la presente) y una región constante de la cadena liviana. La región constante de la cadena liviana consiste en un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse además en regiones hipervariables, conocidas como regiones de determinación de la complementariedad (CDR), y separadas por regiones conservadas conocidas como regiones de marco de trabajo (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

[00101] El término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo”), tal como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al

antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo completo. Estas formas de realización de anticuerpos también pueden tener formatos biespecíficos, de especificidad doble o multiespecíficos, es decir, pueden unirse específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión que abarca el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento Fab', un Fab que contiene una región bisagra que no está unido mediante un disulfuro ya sea mediante una reducción suave o por mutación o supresión de cisteínas; (iii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos entre sí por medio de un puente disulfuro en la región de bisagra; (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341: 544-546, Winter *et al.*, publicación PCT WO 90/05144 A1 incorporada en la presente a modo de referencia), que comprende un solo dominio variable; y (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, a saber, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden conectarse uno con otro usando un conector sintético que les permita prepararlos como una sola cadena de proteína, donde las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.*, (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena simple también se consideran dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos, tales como los anticuerpos bivalentes o *diabodies*. Los diabodies son anticuerpos bivalentes y biespecíficos donde los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena de polipéptido, pero usando un conector que es

demasiado corto para que los dos dominios se combinen en la misma cadena, que lo que se fuerza el apareamiento de dichos dominios con dominios complementarios de una cadena diferente y la formación de dos sitios de unión al antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448; Poljak, R. J., *et al.*, (1994) *Structure* 2: 1121-1123). Estas porciones de unión a anticuerpos son conocidas en el arte (Kontermann y Dubel eds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag; Nueva York; 790 páginas (ISBN 3-540-41354-5).

[00102] Un “aminoácido ácido” se refiere a un aminoácido que presenta una carga negativa a pH fisiológico. Los aminoácidos ácidos codificados genéticamente incluyen ácido aspártico (Asp; D) y ácido glutámico (Glu; E).

[00103] Un “aminoácido no ácido” se refiere a un aminoácido que no es un aminoácido ácido. Los aminoácidos no ácidos incluyen arginina (Arg; R), histidina (His; H), lisina (Lys; K), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), asparagina (Asn; N), glutamina (Gln; Q), cisteína (Cys; C), glicina (Gly; G), prolina (Pro; P), alanina (Ala; A), valina (Val; V), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), tirosina (Tyr; Y) y triptofano (Trp; W).

[00104] Un “aminoácido básico” se refiere a un aminoácido que presenta una carga positiva a pH fisiológico. Los aminoácidos básicos codificados genéticamente incluyen histidina (His; H), lisina (Lys; K) y arginina (Arg; R).

[00105] Según se usa en la presente, el término “muestra biológica” se refiere a una muestra obtenida de un sujeto, que incluye una muestra de un tejido o fluido de origen biológico obtenido *in vivo* o *in vitro*. Dichas muestras pueden comprender, pero en un sentido no taxativo, un fluido corporal (por ejemplo, sangre, plasma sanguíneo, suero, leche, fluido espinal, ascites u orina), órganos, tejidos, fracciones y células aisladas de mamíferos incluyendo seres humanos. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de la muestra biológica que

incluye tejidos (por ejemplo, porciones de secciones de un órgano o tejido). Las muestras biológicas también pueden incluir extractos de una muestra biológica, por ejemplo, un antígeno de un fluido biológico (por ejemplo, sangre u orina).

[00106] El término “química click” se refiere a reacciones particulares para la síntesis y/o conjugación de proteínas que son de alto rendimiento, muy selectivas, confiables y limpias. Véase, por ejemplo, King *et al.*, “Developments in the Field of Bioorthogonal Bond Forming Reactions – Past and Present Trends”, *Bioconjug. Chem.*, (2014) 25(5): 825-839; McKay *et al.*, “Click Chemistry in Complex Mixtures: Bioorthogonal Bioconjugation”, *Chem. Biol.*, (2014) 21(9): 1075-1101.

[00107] El término “quimerizado”, “quimérico”, “anticuerpo quimérico” y términos similares se refieren a una inmunoglobulina que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena liviana, es decir, una región de unión al antígeno, de una fuente o especie y por lo menos una porción de una región constante de la cadena pesada y una región constante de la cadena liviana derivadas de una fuente o especie diferente. Estas porciones se pueden unir químicamente mediante técnicas convencionales (por ejemplo, síntesis) o se pueden preparar como un polipéptido contiguo usando técnicas de ingeniería genética (por ejemplo, se puede expresar ADN que codifica las porciones de proteínas del anticuerpo quimérico para producir una cadena de polipéptidos contiguos). Otras formas de “inmunoglobulinas quiméricas” que abarca la presente divulgación son aquellas en donde se ha modificado o cambiado la clase o subclase con respecto a la inmunoglobulina original (también denominadas “inmunoglobulinas de cambio de clase”). En toda la divulgación, las inmunoglobulinas quiméricas se denominan “xi.” En la presente, una “inmunoglobulina quimérica” y términos similares se refieren a la secuencia de la inmunoglobulina antes que al proceso usado para generar el anticuerpo.

[00108] Según se usa en la presente, un “agente funcional” se refiere a un

agente que presenta propiedades terapéuticas, de diagnóstico u otras propiedades funcionales. En una forma de realización, un agente funcional puede ser un agente terapéutico. En otra forma de realización, un agente funcional puede ser un agente de diagnóstico. Los agentes funcionales pueden ser moléculas grandes o moléculas pequeñas. Los agentes funcionales de moléculas grandes incluyen, pero en un sentido no taxativo, un anticuerpo y porciones de unión al antígeno del mismo. Los agentes funcionales de moléculas pequeñas incluyen, pero en un sentido no taxativo, agentes quimioterapéuticos, agente citotóxicos, antibióticos, otros compuestos orgánicos que pueden regular un proceso biológico (por ejemplo, fármacos) y polipéptidos.

[00109] El término “humanizado”, “inmunoglobulina humanizada” y términos similares se refieren a inmunoglobulinas en las cuales se han modificado las regiones de marco o las “regiones determinantes de complementariedad” (CDR) para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina parental. Por lo general, las inmunoglobulinas humanizadas son inmunoglobulinas humanas (inmunoglobulina receptora) en donde los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (inmunoglobulina donante), tal como de ratón, rata, conejo o un primate no humano, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos FR de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. Además, las inmunoglobulinas humanizadas pueden comprender residuos que no se observan en la inmunoglobulina receptora o la inmunoglobulina donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el desempeño de la inmunoglobulina. En general, la inmunoglobulina humanizada comprenderá sustancialmente todos entre por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en donde todos o

sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. La inmunoglobulina humanizada también puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de una inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Riechmann, L., *et al.*, *Nature* 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M. S., *et al.*, *Nature* 314 (1985) 268-270. En la presente, una “inmunoglobulina humanizada” y términos similares se refieren a la secuencia de la inmunoglobulina antes que al proceso usado para generar la inmunoglobulina.

[00110] El término “agente de diagnóstico” se refiere a un compuesto que puede ser de utilidad para estudios de obtención de imágenes *in vivo* tales como CT, MRI y rayos X y/o estudios de obtención de imágenes *in vitro*. Los ejemplos no taxativos de agentes de diagnósticos incluyen un fluoróforo, un colorante fluorescente, un radionúclido y una enzima.

[00111] El término “inmunoglobulina donante” se refiere a una inmunoglobulina no humana que contribuye con secuencias de aminoácidos de sus regiones variables, CDR u otros fragmentos funcionales o análogos de los mismos a la inmunoglobulina humanizada, y de esa manera le provee a la inmunoglobulina humanizada la especificidad antigénica y la actividad neutralizante características de la inmunoglobulina donante.

[00112] El término “inmunoglobulina receptora” se refiere a una inmunoglobulina heteróloga para la inmunoglobulina donante, que provee las secuencias de aminoácidos de sus regiones de marco de la cadena pesada y/o liviana y/o sus regiones constantes de las cadenas pesada y/o liviana a la inmunoglobulina humanizada. La inmunoglobulina receptora puede derivar de cualquier mamífero. En formas de realización preferidas, la inmunoglobulina receptora no es inmunogénica en humanos. Preferiblemente, la inmunoglobulina

receptora es una inmunoglobulina humana.

[00113] La “humanización” se refiere a un proceso para generar una inmunoglobulina humanizada e incluye cualquier proceso para generar inmunoglobulinas humanizadas que tengan las características anteriores, que incluyen, pero en un sentido no taxativo, humanización *in silico*, modificar CDR de especies/huésped introduciéndolas en inmunoglobulinas humanas, sustituyendo los residuos de la región de marco de una inmunoglobulina quimérica para que coincida con una correspondiente región de marco humana, etc.

[00114] Una “inmunoglobulina”, según se usa en la presente, se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina que incluyen las cadenas livianas kappa y lambda y las cadenas pesadas alfa, gamma, delta, épsilon y mu. Las “cadenas livianas” de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de la región variable por el extremo NH₂-terminal (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda por el extremo COOH-terminal. Las “cadenas pesadas” de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos), están codificadas de manera similar por un gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante mencionados antes, por ejemplo, gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). Las “inmunoglobulinas” incluyen: (a) polipéptidos de inmunoglobulina, es decir, polipéptidos de la familia de inmunoglobulinas que contiene un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno específico, incluyendo todos los isotipos de inmunoglobulina (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD e IgY), clases (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂), subclases y varias formas monoméricas y poliméricas de cada isotipo, a menos que se especifique de otra manera; y (b) variantes sustituidas de manera conservadora de dichos polipéptidos de

inmunoglobulina que se unen de manera inmuno-específica al antígeno. Las inmunoglobulinas se describen en general, por ejemplo, en Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988).

[00115] El término "transglutaminasa microbiana" se refiere a un tipo de transferasa que cataliza una reacción de transferencia de acilo. Una forma de realización preferida comprende el uso de una transglutaminasa microbiana para catalizar una reacción de transferencia de acilos entre una primera unidad que contiene un residuo glutamina (donante de acilo) y una segunda unidad que contiene un grupo amina primaria (aceptor de acilo). Se prefiere que el residuo glutamina reactivo esté expuesto al solvente.

[00116] Una forma de la inmunoglobulina divulgada en la presente constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir un tetrámero y consistir en dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, donde cada par tiene una cadena liviana y una cadena pesada. En general, en cada par, las regiones variables de la cadena liviana y la cadena pesada son responsables juntas de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo.

[00117] Además de anticuerpos, las inmunoglobulinas pueden existir en una variedad de formas adicionales que incluyen, por ejemplo, fragmentos de unión al antígeno o porciones de una inmunoglobulina de longitud completa, tales como fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂ y Fv; y formatos de anticuerpo alternativos tales como inmunoglobulinas de cadena simple (scFV y scFab), *diabodies*, *triabodies*, *tetrabodies*, anticuerpos lineales y anticuerpos multiespecíficos, por nombrar unos pocos. Véase, por ejemplo, James D. Marks, *Antibody Engineering*, Capítulo 2, Oxford University Press (1995) (Carl K. Borrebaeck, Ed.).

[00118] En una forma de realización, una inmunoglobulina puede comprender un fragmento Fab. En otra forma de realización, una inmunoglobulina

puede comprender un dominio CH3. En otra forma de realización, una inmunoglobulina puede comprender una cadena pesada.

[00119] Según se usa en la presente, el término “inmunoespecíficamente” se refiere a la capacidad de una inmunoglobulina para unirse de manera específica con un antígeno contra el cual se generó la inmunoglobulina y no se une específicamente a otros péptidos o proteínas. Una inmunoglobulina que se une inmunoespecíficamente a un antígeno contra el cual se generó la inmunoglobulina no se puede unir a otros polipéptidos o proteínas, o se puede unir a otros polipéptidos o proteínas con una menor afinidad de unión que el antígeno contra el cual se generó la inmunoglobulina determinada, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en el arte. Una inmunoglobulina se une inmunoespecíficamente a un antígeno contra el cual se generó la inmunoglobulina cuando se une al antígeno con una mayor afinidad de unión que a cualquier antígeno de reacción cruzada determinada usando técnicas experimentales, tales como, pero en un sentido no taxativo, radioinmunoensayos (RIA) y ensayos de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA) (Véase, por ejemplo, Paul, ed., *Fundamental Immunology*, 2ª ed., Raven Press, Nueva York, páginas 332-336 (1989) por una descripción de la especificidad de anticuerpos.).

[00120] Un “conector”, según se usa en la presente, se refiere a un espaciador, que puede ser de cadena lineal o ramificada, para unir una inmunoglobulina (a través de un sustrato donante de acilo) a un agente funcional o un grupo reactivo. Dichos conectores pueden ser clivables (por ejemplo, lábil a ácidos o clivables por proteasas) o no clivables. En una forma de realización, un conector es una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, un conector comprende uno o más aminoácidos y una unidad de polietilenglicol (PEG).

[00121] El término “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo que deriva de un solo clon celular, que incluye cualquier clon celular eucariota o

procariota, o un clon de fago, y no al método con el cual se produjo. Un anticuerpo monoclonal presenta una sola especificidad y afinidad de unión por un epítopo particular. El término “anticuerpo monoclonal” no se limita a los anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridomas.

[00122] El término “nativo” se refiere a la secuencia de inmunoglobulina de tipo salvaje de la especie en la cual se deriva la inmunoglobulina.

[00123] Según se usa en la presente, la “identidad porcentual” y términos similares se usa para describir las relaciones de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos, polinucleótidos, proteínas o polipéptidos, y se comprende en el contexto y junto con términos que incluyen: (a) secuencia de referencia, (b) ventana de comparación, (c) identidad de secuencia y (d) porcentaje de identidad de secuencia.

(a) Una “secuencia de referencia” es una secuencia definida usada como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia específica; por ejemplo, un segmento o la totalidad de la secuencia de un ADNc o de un gen, o la secuencia completa del ADNc o del gen. En el caso de polipéptidos, los ejemplos de longitudes de la secuencia de polipéptidos de referencia incluyen por lo menos aproximadamente 16 aminoácidos, por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos, por lo menos aproximadamente 25 aminoácidos, por lo menos aproximadamente 35 aminoácidos, por lo menos aproximadamente 50 aminoácidos o por lo menos aproximadamente 100 aminoácidos. En el caso de ácidos nucleicos, los ejemplos de longitudes de la secuencia de ácidos nucleicos de referencia incluyen por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 60 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 75 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 100 nucleótidos o por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos, o cualquier número entero de ellos o entre ellos.

(b) Una “ventana de comparación” incluye las referencias a un segmento

contiguo y específico de una secuencia de polinucleótidos o de polipéptidos, donde la secuencia de polinucleótidos o de polipéptidos se puede comparar con una secuencia de referencia y donde la porción de la secuencia de polinucleótidos o de polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones, sustituciones o supresiones (es decir, faltas de coincidencia o huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones, sustituciones o supresiones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. Los ejemplos de ventanas de comparación pueden ser de por lo menos 20 nucleótidos o aminoácidos contiguos de longitud y, opcionalmente, puede ser de 30, 40, 50, 100 o más. Los especialistas en el arte comprenderán que, para evitar una similitud elevada errónea con una secuencia de referencia debido a la inclusión de faltas de coincidencia en la secuencia de polinucleótidos o de polipéptidos, típicamente se introduce una penalidad por falta de coincidencia y se resta de la cantidad de coincidencias.

(c) Los métodos de alineamiento de secuencias para realizar una comparación son bien conocidos en el arte. El alineamiento óptimo de secuencias para una comparación se puede efectuar con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2: 482, 1981; con el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48: 443, 1970; mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8: 2444, 1988; mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos, que incluyen, pero en un sentido no taxativo, CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, Calif., GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 7 Science Dr. Madison, Wis., EEUU; el programa CLUSTAL está bien descrito en Higgins y Sharp, *Gene*, 73: 237-244, 1988; Corpet, *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 16: 881-90, 1988; Huang, *et al.*, *Computer Applications in the*

Biosciences, 8: 1-6, 1992; y Pearson, *et al.*, *Methods in Molecular Biology*, 24: 7-331, 1994. La familia de programas BLAST que se puede usar en las búsquedas de similitud de bases de datos incluye, BLASTN para secuencias de consulta de nucleótidos contra secuencias de la base de datos de nucleótidos; BLASTX para las secuencias de consulta de nucleótidos contra secuencias de la base de datos de proteínas; BLASTP para las secuencias de consulta de proteínas contra secuencias de la base de datos de proteínas; TBLASTN para las secuencias de consulta de proteínas contra secuencias de la base de datos de nucleótidos; y TBLASTX para las secuencias de consulta de nucleótido contra secuencias de la base de datos de nucleótidos. Véase, *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 19, Ausubel, *et al.*, Eds., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 1995. En el futuro, seguramente habrá nuevas versiones de los programas precedentes o programas completamente nuevas disponibles en el futuro, y se podrán utilizar con la presente divulgación.

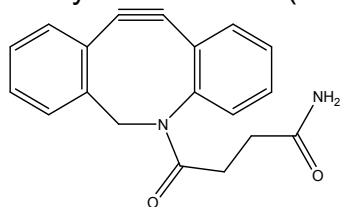
(d) La “identidad porcentual” es el valor determinado por comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima en una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones, sustituciones o supresiones (es decir, faltas de coincidencia o huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones, sustituciones o supresiones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando la cantidad de posiciones en las cuales existe una base de ácido nucleico idéntica en ambas secuencias, a fin de obtener la cantidad de posiciones de coincidencia, dividiendo la cantidad de posiciones de coincidencia por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando la cantidad total de posiciones por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

[00124] Una “cantidad farmacéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad

de una inmunoglobulina que permite tratar a un sujeto.

[00125] Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a los componentes de una formulación farmacéutica para una inmunoglobulina descrita en la presente para su administración a un sujeto. Por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable se puede basar en liposomas, basar en lípidos y/o basar en nanopartículas.

[00126] El término “grupo reactivo”, según se usa en la presente, se refiere a un grupo químico funcional que puede reaccionar con otros compuestos, tales como agentes funcionales, para formar por lo menos un enlace covalente. En una forma de realización, los grupos reactivos son reactivos en las reacciones de acoplamiento de química click. Los ejemplos no taxativos de grupos reactivos incluyen (1R,8S,9s)-biciclo[6,1,0]non-4-en-9-ilmetanol (BCN),



(dibenzociclooctino; DBCO), trans-cicloocteno(TCO), azido (N_3), alquino, tetrazinmetilciclopropeno, norborneno, hidrazida/hidrazina y aldehído.

[00127] El término “sujeto”, según se usa en la presente, se refiere a un organismo humano o no humano. Por lo tanto, los métodos, inmunoglobulinas e inmunoglobulinas conjugadas que se describen en la presente son aplicables a enfermedades y condiciones humanas y veterinarias. Los sujetos pueden ser “pacientes”, es decir, seres humanos vivos u organismos no humanos que reciben cuidado médico por una enfermedad o condición, u organismos humanos o no humanos sin una enfermedad definida que están siendo investigados por signos de patología o por la presencia/ausencia de una condición particular.

[00128] Una “sustitución” se refiere al reemplazo de un residuo de aminoácido por otro. La “sustitución” incluye, por ejemplo, mutaciones de sentido

erróneo en uno o más pares de bases de ADN que codifican el residuo de aminoácido o modificación de la proteína para intercambiar un aminoácido por otro.

[00129] Según se usa en la presente, “tratar” y términos similares se refieren a reducir la severidad y/o frecuencia de los síntomas de una enfermedad, eliminar los síntomas de una enfermedad y/o la causa subyacente de dichos síntomas, reducir la frecuencia o probabilidad de los síntomas de la enfermedad y/o su causa subyacente y mejorar o remediar el daño causado, de manera directa o indirecta, por la enfermedad.

[00130] El término “agente terapéutico” se refiere a una molécula grande o pequeña que puede ser administrada a un sujeto que lo necesita para tratar una condición. Los agentes terapéuticos se pueden administrar para tratar, o prevenir el inicio, demorar el progreso o aliviar uno o más síntomas de una condición médica en sujetos que sufren de la misma. Los agentes terapéuticos incluyen, pero en un sentido no taxativo, un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo, un agente quimioterapéutico, un agente radioactivo, un agente citotóxico, un antibiótico, etc. En una forma de realización, el agente terapéutico es una molécula pequeña. En otra forma de realización, el agente terapéutico es un polipéptido.

[00131] Según se usa en la presente, “90% idéntica a” abarca por lo menos 90% idéntica, 91% idéntica, 92% idéntica, 93% idéntica, 94% idéntica, 95% idéntica, 96% idéntica, 97% idéntica, 98% idéntica, 99% idéntica o 100% idéntica al elemento de referencia (por ejemplo, una secuencia biológica).

[00132] Las siguientes abreviaturas se usan en toda la divulgación: conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC); relación de fármaco a anticuerpo (DAR); región de marco (FR); región determinante de complementariedad (CDR); auristatina F (AuF); región variable pesada (VH); región variable liviana (VL); variable kappa (Vk); región constante gamma (Cγ); región constante kappa (Cκ); anticuerpo monoclonal (mAb); lisina en la posición de aminoácido 447 de la cadena

pesada de la inmunoglobulina, numerada usando el sistema de numeración EU (Lys447).

Generación de inmunoglobulinas conjugadas

[00133] En la presente se divulgan métodos para generar una inmunoglobulina conjugada, donde dichos métodos comprenden: poner una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, en contacto con una transglutaminasa microbiana y un agente funcional que comprende un sustrato donante de acilo, a) en donde la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende un residuo lisina modificado, en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, b) en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina, y c) en donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo sobre el agente funcional, generando de esa manera la inmunoglobulina conjugada.

[00134] En la presente también se divulgan métodos para generar una inmunoglobulina conjugada, donde dichos métodos comprenden: i) poner una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, en contacto con una transglutaminasa microbiana y un sustrato donante de acilo, a) en donde la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende un residuo lisina modificado, en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, b) en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina y un grupo reactivo, en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo, y ii) conjugar un agente

funcional con el grupo reactivo del sustrato donante de acilo, en donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, generando de esa manera la inmunoglobulina conjugada.

[00135] La conjugación se puede efectuar mediante disolución de un agente funcional que comprende un sustrato donante de acilo en una solución de disolución y poner el agente funcional disuelto en contacto con la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y transglutaminasa microbiana en una solución amortiguadora de conjugación. La conjugación también se puede efectuar mediante disolución de un sustrato donante de acilo en una solución de disolución y poner el sustrato donante de acilo en contacto con la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y una transglutaminasa microbiana en una solución amortiguadora de conjugación.

[00136] Como agentes funcionales no solubles en agua y sustratos donantes de acilo, las soluciones de disolución apropiadas incluyen solventes orgánicos miscibles en agua tales como dimetilsulfóxido (DMSO). Como agentes funcionales solubles en agua y sustratos donantes de acilo, las soluciones de disolución apropiadas incluyen, pero en un sentido no taxativo, agua o soluciones acuosas amortiguadas, tal como una solución salina amortiguada con fosfato, pH 7.2 (1 x PBS) o DPBS.

[00137] Las concentraciones apropiadas del agente funcional o del sustrato donante de acilo incluyen entre aproximadamente 10 μ M y aproximadamente 800 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 40 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 55 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 70 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 90 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 75 mM, entre

aproximadamente 10 mM y aproximadamente 60 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 40 mM, o entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 30 mM.

[00138] En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 10 μ M. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 25 μ M. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 50 μ M. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 100 μ M. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 250 μ M. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 500 μ M. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 750 μ M. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 20 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 30 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 40 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 50

mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 60 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 70 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 80 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 90 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 100 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 150 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 200 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 250 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 300 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 350 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 400 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 450 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 500 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 550 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 600 mM. En algunas formas de realización, la concentración del

agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 650 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 700 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 750 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 800 mM.

[00139] Las concentraciones apropiadas de la inmunoglobulina incluyen entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, entre aproximadamente 0,5 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 12 mg/ml, entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml, o entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 2 mg/ml, entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 30 mg/ml, entre aproximadamente 20 mg/ml y aproximadamente 45 mg/ml, entre aproximadamente 35 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, entre aproximadamente 45 mg/ml y aproximadamente 60 mg/ml, entre aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 75 mg/ml, entre aproximadamente 60 mg/ml y aproximadamente 85 mg/ml o entre aproximadamente 80 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 0,1 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 0,5 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 1 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de

la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 2 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 5 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 10 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 15 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 20 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 25 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 30 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 35 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 40 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 45 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 50 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 55 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 60 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 65 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 70 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 75 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 80 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 85 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de

aproximadamente 90 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 95 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de la inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 100 mg/ml.

[00140] Las relaciones apropiadas entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina incluyen entre aproximadamente 1:1 y 100:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y sustrato donante de acilo:inmunoglobulina comprende entre aproximadamente 25:1 y aproximadamente 75:1. En otra forma de realización, la relación entre un agente funcional y sustrato donante de acilo:inmunoglobulina comprende entre aproximadamente 40:1 y aproximadamente 60:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 1:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 2:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 3:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 4:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 5:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 6:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 7:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 8:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 9:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente

funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 10:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 11:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 12:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 13:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 14:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 15:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 16:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 17:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 18:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 19:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 20:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 25:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 30:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 35:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 40:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina

puede ser de 45:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 50:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 60:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 70:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 80:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 90:1. En algunas formas de realización, la relación entre un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser de 100:1.

[00141] El contacto se puede realizar en numerosas soluciones amortiguadoras de conjugación apropiadas que incluyen, por ejemplo, DPBS, 1x PBS, pH 7.2, fosfato de sodio, fosfato de potasio, borato de sodio, Tris y HEPES, por nombrar sólo unas pocas. La concentración de la solución amortiguadora de conjugación incluye entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 2 M, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 1 M, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 30 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 45 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 60 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 75 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 90 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 75 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 60 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 45 mM o entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 30 mM. En algunas

formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 10 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 20 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 30 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 40 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 50 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 60 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 70 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 80 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 90 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 100 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 250 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 500 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 750 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 1 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 1,25 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 1,5 M. En algunas formas de

realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 1,75 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 2 M.

[00142] La solución amortiguadora de conjugación puede incluir además cloruro de sodio. Las concentraciones apropiadas de cloruro de sodio incluyen entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 2 M, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 1 M, entre aproximadamente 1 M y aproximadamente 2 M, entre aproximadamente 500 mM y aproximadamente 1,5 M, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 75 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 150 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 200 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 250 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 300 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 350 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 400 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 400 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 350 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 300 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 250 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 50 mM o entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 25 mM. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 25 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 50 M. En algunas formas de realización, la concentración

de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 75 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 100 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 150 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 200 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 250 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 300 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 350 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 400 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 500 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 750 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 1 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 1,25 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 1,5 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 1,75 M. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 2 M.

[00143] El pH de la solución amortiguadora de conjugación puede comprender entre aproximadamente 4 y aproximadamente 9. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 8. En otra forma de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7. En algunas formas de realización, el pH

de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 4. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 4,5. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 5. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 5,5. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 6,0. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 6,5. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 6,6. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 6,7. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 6,8. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 6,9. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,0. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,1. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,2. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,3. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,4. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,5. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,6. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,7. En algunas formas de realización, el pH de la

solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,8. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,9. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 8,0. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 8,1. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 8,2. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 8,3. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 8,4. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 8,5. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 9.

[00144] A fin de facilitar la solubilidad de un agente funcional o un sustrato donante de acilo en la solución amortiguadora de conjugación, una concentración final de solvente orgánico miscible en agua en la solución amortiguadora de conjugación puede ser de entre aproximadamente 0% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 2% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 5% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 8% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 11% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 16% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 18%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 15%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 12%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 10%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 8%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 6% o entre aproximadamente 0% y aproximadamente 2%.

[00145] La solución amortiguadora de conjugación puede comprender además propilenglicol para facilitar la solubilidad del compuesto tiol-reactivo en la

solución amortiguadora de conjugación. Las concentraciones apropiadas de propilenglicol incluyen entre aproximadamente 1% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 30% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 40% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 40%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 20%. En algunas formas de realización, la concentración de propilenglicol puede ser de aproximadamente 1% o aproximadamente 5%. En algunas formas de realización, la concentración de propilenglicol puede ser de aproximadamente 10%. En algunas formas de realización, la concentración de propilenglicol puede ser de aproximadamente 20%. En algunas formas de realización, la concentración de propilenglicol puede ser de aproximadamente 30%. En algunas formas de realización, la concentración de propilenglicol puede ser de aproximadamente 40%. En algunas formas de realización, la concentración de propilenglicol puede ser de aproximadamente 50%.

[00146] La solución amortiguadora de conjugación puede comprender además un detergente no iónico para facilitar la solubilidad de la inmunoglobulina conjugada en la solución amortiguadora de conjugación. Los ejemplos de detergentes no iónicos incluyen, pero en un sentido no taxativo, polisorbato-20 o polisorbato-80. Las concentraciones apropiadas de detergente no iónico incluyen entre aproximadamente 0% y aproximadamente 1%, entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 1%, entre aproximadamente 0,3% y aproximadamente 1%, entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 1%, entre aproximadamente 0,7% y aproximadamente 1%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 0,8%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 0,6%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 0,4% o entre aproximadamente 0% y aproximadamente 0,2%. En algunas formas de realización, la concentración del

detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,1%. En algunas formas de realización, la concentración del detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,2%. En algunas formas de realización, la concentración del detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,3%. En algunas formas de realización, la concentración del detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,4%. En algunas formas de realización, la concentración del detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,5%. En algunas formas de realización, la concentración del detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,6%. En algunas formas de realización, la concentración del detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,7%. En algunas formas de realización, la concentración del detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,8%. En algunas formas de realización, la concentración del detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,9%. En algunas formas de realización, la concentración del detergente no iónico puede ser de aproximadamente 1,0%.

[00147] El contacto se puede realizar por entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 30 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 36 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 42 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 42 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 36 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 30 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 18 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 12 horas, aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 1 hora,

aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas o entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 6 horas. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar por aproximadamente 30 minutos. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar por aproximadamente 1 hora. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar por aproximadamente 1,5 horas. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar por 2 horas. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar por 6 horas. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar por 12 horas. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar por 18 horas. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar por 24 horas. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar por 30 horas. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar por 36 horas. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar por 42 horas. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar por 48 horas.

[0148] La temperatura del contacto puede ser de entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 50 °C, entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 22 °C y aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 24 °C y aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 26 °C y aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 28 °C y aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 34 °C y aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 34 °C, entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 32 °C, entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 30 °C, entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 28 °C, entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 26 °C o entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 24 °C. En algunas formas de

realización, el contacto se puede realizar a 4 °C. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar a 18 °C. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar a 20 °C. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar a 22 °C. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar a 24 °C. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar a 26 °C. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar a 28 °C. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar a 30 °C. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar a 32 °C. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar a 34 °C. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar a 37 °C. En algunas formas de realización, el contacto se puede realizar a 50 °C.

[0149] Es posible separar un sustrato donante de acilo o agente funcional no incorporado de la inmunoglobulina conjugada mediante una cromatografía de desalado usando una cantidad de resinas apropiadas que incluyen, en un sentido no taxativo, la resina G-25, resina G-50, Biogel P10 u otras resinas con rangos de límites de exclusión de 5.000-10.000 Da. La cromatografía se puede realizar en formato de columna o en formato de columna spin, según la escala. Las soluciones amortiguadoras apropiadas para el desalado incluyen, por ejemplo, DPBS, 1x PBS, fosfato de sodio, fosfato de potasio, borato de sodio, Tris, o basadas en HEPES se pueden sustituir por 1x PBS.

[0150] En una primera forma de realización, el agente funcional que comprende un sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina conjugado con el residuo lisina modificado a través del sustrato donante de acilo. En esta primera forma de realización, el agente funcional se combina con el sustrato donante de acilo antes de la conjugación con la inmunoglobulina mediante reacción del grupo reactivo sobre el sustrato donante de acilo con el agente funcional. En una segunda forma de realización, el sustrato donante de acilo que comprende un

residuo glutamina y un grupo reactivo se conjuga primero con la inmunoglobulina, y luego se une el grupo reactivo a un agente funcional.

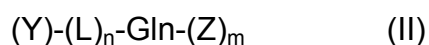
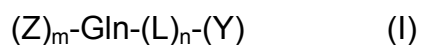
[0151] Los sustratos donantes de acilos pueden comprender un conector, “L”. Los conectores pueden ser conectores no clivables o conectores clivables. Los ejemplos de conectores incluyen, por ejemplo, conectores que contienen disulfuro, conectores basados en acetal y conectores basados en cetel. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector no clivable. Los conectores no clivables apropiados incluyen, pero en un sentido no taxativo, uno o más aminoácidos, polietilenglicol (PEG) o un alquilo. En algunas formas de realización, el conector puede comprender PEG. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector clivable. Los conectores clivables adecuados incluyen, por ejemplo, valina-citrulina-para-aminobencilo. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector que contiene disulfuro. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector basado en acetal. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector basado en cetel. Un conector también puede comprender uno o más aminoácidos, solos o combinados con otro conector, tal como uno o más grupos PEG.

[0152] El sustrato donante de acilo que comprende un residuo glutamina puede estar presente en parte o unido a un agente funcional. Los agentes funcionales adecuados incluyen, por ejemplo, fluoróforos, colorantes fluorescentes, polipéptidos, inmunoglobulinas, antibióticos, ácidos nucleicos, radionúclidos, conectores químicos, moléculas pequeñas, quelantes, lípidos, ácidos nucleicos (tales como ADN o ARN) y fármacos. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un fluoróforo. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un colorante fluorescente. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un polipéptido. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender una inmunoglobulina. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un antibiótico. En algunos aspectos, el agente funcional puede

comprender un ácido nucleico (tal como ADN o ARN). En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un radionúclido. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender una molécula pequeña. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un quelantes (por ejemplo, DOTA, CHX-A"-DTPA, NOTA, entre otros). En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un lípido. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un fármaco. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender una combinación de cualquiera de los agentes funcionales enumerados precedentemente.

[0153] El sustrato donante de acilo (es decir, un primer sustrato donante de acilo) se puede unir a un segundo sustrato donante de acilo o conector, donde el segundo sustrato donante de acilo o conector está unido a una segunda inmunoglobulina que tiene una segunda región variable de la cadena pesada y una segunda región variable de la cadena liviana, donde la segunda región variable de la cadena pesada tiene un residuo lisina modificado. Por ejemplo, el primer sustrato donante de acilo y el segundo sustrato donante de acilo pueden tener un primer y segundo conector químico como primer y segundo agentes funcionales respectivamente. Los primero y segundo conectores químicos se pueden unir entre sí mediante numerosos medios apropiados que incluyen, por ejemplo, la química clic.

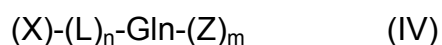
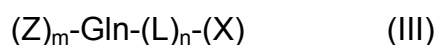
[0154] En una forma de realización, el agente funcional que comprende un sustrato donante de acilo es acorde con las Fórmulas (I) o (II):



en donde Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido; Gln es un residuo de aminoácido glutamina; cada L es de manera independiente un conector de cadena lineal o ramificada de entre 1 y 20 átomos de carbono, en donde

uno o más de los átomos de carbono se puede reemplazar de manera opcional e independiente con un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y de nitrógeno puede estar sustituido opcionalmente; o cada L es de manera opcional e independiente un residuo de aminoácido; m es un número entero entre 0 y 5; n es un número entero entre 0 y 5; e Y es un agente funcional.

[0155] En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con las Fórmulas (III) o (IV):



en donde

en donde Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido; Gln es un residuo de aminoácido glutamina; cada L es de manera independiente un conector de cadena lineal o ramificada de entre 1 y 20 átomos de carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono se puede reemplazar de manera opcional e independiente con un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y de nitrógeno puede estar sustituido opcionalmente; o cada L es de manera opcional e independiente un residuo de aminoácido; m es un número entero entre 0 y 5; n es un número entero entre 0 y 5; y X es un grupo reactivo.

[0156] En una forma de realización, Z es un grupo CBZ. En otra forma de realización, Z es un residuo de aminoácido.

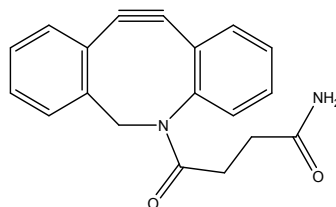
[0157] En una forma de realización, L es un residuo de aminoácido. En una forma de realización, n es 2-5, y cada L es de manera independiente un residuo de aminoácido. En otra forma de realización, L es un conector lineal o ramificado de entre 1 y 20 átomos de carbono, donde uno o más de los átomos de carbono se puede reemplazar opcional e independientemente por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y donde cada átomo de carbono y nitrógeno puede estar sustituido opcionalmente. En una forma de realización, L es una unidad de polietilenglicol

(PEG). En otra forma de realización, n es 2-5, y uno o más L comprenden uno o más aminoácidos y uno o más grupos L adicionales comprenden una unidad de polietilenglicol (PEG).

[0158] En una forma de realización, m es 0. En otra forma de realización, m es 1. En otra forma de realización, m es 2. En otra forma de realización, m es 3. En otra forma de realización, m es 4. En otra forma de realización, m es 5.

[0159] En una forma de realización, n es 0. En otra forma de realización, n es 1. En otra forma de realización, n es 2. En otra forma de realización, n es 3. En otra forma de realización, n es 4. En otra forma de realización, n es 5.

[0160] En una forma de realización, X es (1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetanol (BCN).



En otra forma de realización, X es (dibenzociclooctina; DBCO). En otra forma de realización, X es trans-cicloocteno (TCO). En otra forma de realización, X es azido (N_3). En otra forma de realización, X es alquino. En otra forma de realización, X es tetrazina metilciclopropeno. En otra forma de realización, X es norborneno. En otra forma de realización, X es hidrazida/hidrazina. En otra forma de realización, X es aldehído.

[0161] En una forma de realización, para un sustrato donante de acilo de acuerdo con la fórmula (I), Z es un grupo CBZ; L es una unidad de polietilenglicol (PEG) ($-O((CH_2)_2)-$), etilamina ($-NH((CH_2)_2)-$) o propilamina ($-NH((CH_2)_3)-$); y n es 0, 1, 2 ó 3.

[0162] En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), en donde Z es un grupo CBZ y L es un aminoácido. En una forma de realización, L es Gly. En un aspecto de esta forma de realización, m es 1 y n es

1.

[0163] En una forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (II), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un grupo L es una Gly.

[0164] En otra forma de realización, el agente funcional Y es auristatina F.

[0165] En una forma de realización, para un sustrato donante de acilo de acuerdo con la fórmula (III), Z es un grupo CBZ; L es una unidad de polietilenglicol (PEG) (-O((CH₂)₂)-), etilamina (-NH((CH₂)₂)-) o propilamina (-NH((CH₂)₃)-); y n es 0, 1, 2 ó 3.

[0166] En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), en donde Z es un grupo CBZ y L es un aminoácido. En una forma de realización, L es Gly. En un aspecto de esta forma de realización, m es 1 y n es 1.

[0167] En una forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (IV), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un grupo L es una Gly. En otra forma de realización, el agente funcional Y es auristatina F.

[0168] Los métodos divulgados se pueden realizar con una inmunoglobulina humanizada, o una porción de unión al antígeno de la misma. Por consiguiente, en algunas formas de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, puede ser una inmunoglobulina humanizada, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0169] Los métodos divulgados se pueden realizar con una inmunoglobulina humana, o una porción de unión al antígeno de la misma. Por consiguiente, en algunas formas de realización, la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, puede ser una inmunoglobulina humana, o una porción de unión al antígeno de la misma. En otra forma de realización, la

inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, can be una inmunoglobulina no humana, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0170] En una forma de realización, los métodos divulgados se pueden realizar con una inmunoglobulina IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, el método se realiza con una inmunoglobulina IgG₁, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, el método se realiza con una inmunoglobulina IgG₂, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, el método se realiza con una inmunoglobulina IgG₃, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, el método se realiza con una inmunoglobulina IgG₄, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0171] En una forma de realización, los métodos divulgados se pueden realizar con una inmunoglobulina IgA₁, IgA₂ o IgM, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, el método se realiza con una inmunoglobulina IgA₁, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, el método se realiza con una inmunoglobulina IgA₂, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, el método se realiza con una inmunoglobulina IgM, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, la inmunoglobulina IgA o IgM, o una porción de unión al antígeno de la misma, tiene una extensión de cola. En otra forma de realización, se ha eliminado la extensión de cola de la inmunoglobulina IgA o IgM, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[0172] En una forma de realización, el método se realiza con una inmunoglobulina IgD o IgE, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, el método se realiza con una inmunoglobulina IgD, o una porción de unión al antígeno de la misma. En una forma de realización, el método se realiza con una inmunoglobulina IgE, o una porción de unión al antígeno de la

misma.

[0173] Para los métodos que se describen en la presente, en una forma de realización, la transglutaminasa microbiana es de esporas de *Actinomadura* sp T-2, *Bacillus circulans* BL32, esporas *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterobacter* sp C2361, *Providencia* sp. C1112, *Streptoverticillium mobaraense* (también conocida como *Streptomyces mobarensis*), *Streptomyces platensis* M5218, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces lividans* JT46/pAE053, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces platensis*, *Streptomyces sioyansis*, *Streptoverticillium griseocarneum*, *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191, *Streptoverticillium* sp s-8112 o *Streptococcus suis*. En una forma de realización, la transglutaminasa microbiana es de *Streptomyces mobaraensis*.

[0174] Para los métodos que se describen en la presente, en una forma de realización, la transglutaminasa se aísla de una planta seleccionada entre el grupo formado por *Medicago sativa*, *Beta vulgaris*, *Helianthus tuberosus*, *Zea mays*, *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Oryza sativa* y *Rosmarinus officinalis* L.

[0175] Para los métodos que se describen en la presente, en una forma de realización, la transglutaminasa es de mamífero y se aísla a partir de la Transglutaminasa 1 a 7 y el Factor XIII.

[0176] En una forma de realización, la transglutaminasa es por lo menos 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una transglutaminasa microbiana descrita en la presente. En una forma de realización, la transglutaminasa es por lo menos 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la transglutaminasa microbiana de *Streptomyces mobaraensis*. Las enzimas transglutaminasa se

pueden obtener de Ajinomoto® o Zedira (Nº Producto T001). En otra forma de realización, la transglutaminasa está purificada. En otra forma de realización, la transglutaminasa se expresa de manera recombinante y a continuación se purifica usando métodos conocidos por un especialista en el arte.

[0177] En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de entre aproximadamente 0,1 unidades/ml y aproximadamente 250 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de entre aproximadamente 1 unidad/ml y aproximadamente 25 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de entre aproximadamente 1 unidad/ml y aproximadamente 25 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de aproximadamente 0,1 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de aproximadamente 0,5 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de aproximadamente 1 unidad/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de aproximadamente 5 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de aproximadamente 10 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de aproximadamente 15 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los

métodos que se describen en la presente a una concentración de aproximadamente 20 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de aproximadamente 25 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de aproximadamente 50 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de aproximadamente 75 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de aproximadamente 100 unidades/ml. En una forma de realización, la transglutaminasa enzima está presente en los métodos que se describen en la presente a una concentración de aproximadamente 150 unidades/ml, 200 unidades/ml o 250 unidades/ml.

[0178] Para los métodos provistos en la presente, en una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 200:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 100:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 25:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 20:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 15:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 10:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre

aproximadamente 1:1 y aproximadamente 9:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 8:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 7:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 6:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 5:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 4:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 3:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 2:1. En una forma de realización, la relación de agente funcional a inmunoglobulina es de aproximadamente 1:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 100:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 50:1 y aproximadamente 200:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 50:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 100:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 150:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una

inmunoglobulina es de entre aproximadamente 50:1 y aproximadamente 100:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es de entre aproximadamente 100:1 y aproximadamente 200:1.

[0179] En una forma de realización, la relación de agente funcional a inmunoglobulina es de aproximadamente 20:1. En una forma de realización, la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina es conocida y es reproducible de manera consistente utilizando los métodos que se divulgan en la presente. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 1:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 2:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 3:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 4:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 5:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 6:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 7:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 8:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 9:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 10:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 11:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 12:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 13:1. En algunas formas de

realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 14:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 15:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 16:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 17:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 18:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 19:1. En algunas formas de realización, la relación de un agente funcional:inmunoglobulina es de aproximadamente 20:1. La relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina, según se usa en la presente, se calcula basado en el promedio de la relación de conjugación del agente funcional a una inmunoglobulina en un agrupamiento de anticuerpos en una composición.

[0180] En formas de realización de la presente invención, los sitios aceptores de acilo se modifican genéticamente en una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, ya sea mediante inserción de una lisina entre dos residuos de aminoácidos naturales o mediante la sustitución de un aminoácido natural por una sustitución con lisina. Los residuos lisina modificados se pueden ubicar en una o más posiciones por toda la secuencia de una inmunoglobulina. El contexto óptimo para un sitio aceptor de acilo no solo depende de la posición, sino que también requiere que el residuo de aminoácido adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada no sea un residuo de aminoácido ácido; y que el residuo de aminoácido adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada no sea un residuo de aminoácido ácido o un residuo prolina. La tecnología de conjugación con MTGasa puede utilizar estos sitios modificados para conjugar una variedad de agentes funcionales que contienen al donante de acilo en

la elaboración de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas u otros complejos de mAb-proteína. En otra forma de realización, la combinación de múltiples sitios aceptores de acilo modificados, aumenta la relación de fármaco a anticuerpo (DAR) teórica para cada sitio aceptor de acilo modificado. El aumento de la DAR de un ADC resulta en el suministro de más agentes funcionales a un sujeto por anticuerpo monoclonal, lo cual permite DAR definidas, una mejor homogeneidad de productos y una menor dosificación al paciente.

[0181] En formas de realización provistas en la presente, en donde hay por lo menos dos residuos lisina modificados adicionales, aumenta la relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina basado en el número de residuos lisina modificados adicionales. Por ejemplo, cuando hay dos residuos lisina modificados, que da como resultado un anticuerpo con cuatro sitios de transamidación y una relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 4:1. A modo de otro ejemplo, cuando hay tres residuos lisina modificados, que da como resultado un anticuerpo con seis sitios de transamidación y una relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 6:1.

Inmunoglobulinas conjugadas

[00182] En la presente también se divulgan inmunoglobulinas conjugadas que comprenden cualquiera de las inmunoglobulinas o porciones de unión al antígeno de las mismas, divulgadas en la presente, en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y está conjugado con un agente funcional que comprende un sustrato donante de acilo, en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina. Otras formas de realización adicionales incluyen inmunoglobulinas conjugadas que comprenden cualquiera de las inmunoglobulinas, o

porciones de unión al antígeno de las mismas, divulgadas en la presente, en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y está conjugado sobre un sustrato donante de acilo, en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina y un grupo reactivo, en donde el grupo reactivo se puede hacer reaccionar con un agente funcional después de la conjugación del sustrato donante de acilo con la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

[00183] En una forma de realización, los residuos de aminoácidos que flanquean a la lisina modificada también están modificados, por ejemplo, mutados para optimizar la secuencia de un sitio aceptor de acilo lisina modificado sobre una inmunoglobulina. Por ejemplo, el residuo de aminoácido adyacente e inmediatamente posterior del residuo lisina modificado (por ejemplo, posición de aminoácido +1) se puede mutar a cualquier residuo de aminoácido distinto de prolina o un residuo de aminoácido ácido. El residuo de aminoácido adyacente e inmediatamente anterior al residuo lisina modificado (por ejemplo, posición de aminoácido -1) se puede mutar a cualquier residuo de aminoácido distinto de un residuo de aminoácido ácido.

[00184] En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) se puede mutar a lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es glicina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es lisina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de

aminoácido +1) es alanina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es valina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es leucina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es isoleucina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es metionina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es fenilalanina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es tirosina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es triptofano. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es serina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es treonina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es cisteína. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es asparagina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es glutamina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es histidina. En una forma de realización, el residuo

de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) es arginina. En una forma de realización, en donde el residuo de aminoácido adyacente e inmediatamente posterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) no es prolina, ácido aspártico o ácido glutámico.

[00185] En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) se puede mutar a lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es glicina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es lisina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es alanina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es valina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es leucina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es isoleucina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es metionina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es fenilalanina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es tirosina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado

adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es triptofano. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es serina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es treonina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es cisteína. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es asparagina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es glutamina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es histidina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es prolina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido mutado adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido -1) es arginina. En una forma de realización, en donde el residuo de aminoácido adyacente e inmediatamente anterior a la lisina modificada (posición de aminoácido +1) no es ácido aspártico o ácido glutámico.

[00186] En algunas formas de realización, la inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina humanizada. En otras formas de realización, la inmunoglobulina es humana. En otra forma de realización, la inmunoglobulina es quimérica.

[00187] El sustrato donante de acilo que comprende un residuo glutamina y un grupo reactivo también puede comprender un conector, "L". Asimismo, los agentes funcionales que contienen un sustrato donante de acilo que comprende un

residuo glutamina puede tener un conector entre el agente funcional y la porción del sustrato donante de acilo de la molécula. Los conectores pueden ser conectores no clivables o conectores clivables. Los ejemplos de conectores incluyen, por ejemplo, conectores que contienen disulfuro, conectores basados en acetal y conectores basados en cetal. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector no clivable. Los conectores no clivables adecuados incluyen, pero en un sentido no taxativo, polietilenglicol (PEG) o un alquilo. En algunas formas de realización, el conector puede comprender PEG. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector clivable. Los conectores clivables adecuados incluyen, por ejemplo, valina-citrulina-para-aminobencilo. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector que contiene disulfuro. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector basado en acetal. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector basado en cetal.

[00188] Las inmunoglobulinas conjugadas de la invención comprenden un agente funcional. Los agentes funcionales adecuados incluyen, por ejemplo, un agente terapéutico o un agente de diagnóstico. Los agentes funcionales adecuados incluyen, por ejemplo, fluoróforos, colorantes fluorescentes, polipéptidos, inmunoglobulinas, antibióticos, ácidos nucleicos, radionúclidos, conectores químicos, moléculas pequeñas, quelantes, lípidos y fármacos. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un fluoróforo. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un colorante fluorescente. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un polipéptido. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender una inmunoglobulina. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un antibiótico. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un ácido nucleico (tal como ADN o ARN). En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un radionúclido. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender una

molécula pequeña. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un quelantes (por ejemplo, DOTA, CHX-A"-DTPA, NOTA, entre otros). En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un lípido. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un fármaco. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender una combinación de cualquiera de los agentes funcionales enumerados precedentemente.

[00189] Por lo tanto, las inmunoglobulinas conjugadas divulgadas incluyen, pero en un sentido no taxativo, conjugados de inmunoglobulina-fluoróforo, conjugados de inmunoglobulina-colorante fluorescente, conjugados de inmunoglobulina-polipéptido, conjugados de inmunoglobulina-inmunoglobulina, conjugados de inmunoglobulina-antibióticos, conjugados de inmunoglobulina-ácido nucleico, conjugados de inmunoglobulina-radionúclido, conjugados de inmunoglobulina-conector químico, conjugados de inmunoglobulina-moléculas pequeñas, conjugados de inmunoglobulina-quelante, conjugados de inmunoglobulina-lípido y conjugados de inmunoglobulina-fármaco.

[00190] Cualquiera de las inmunoglobulinas divulgadas en la presente se puede conjugar con cualquiera de los agentes funcionales divulgados en la presente. Por ejemplo, la inmunoglobulina conjugada puede comprender un fluoróforo, colorante fluorescente, polipéptido, inmunoglobulina, antibiótico, ácido nucleico, radionúclido, conector químico, molécula pequeña, quelante, lípido o fármaco.

[00191] En algunas formas de realización, la inmunoglobulina se puede conjugar con un agente antineoplásico de molécula pequeña, tal como una auristatina. En algunos aspectos, el agente funcional puede ser la auristatina F (AuF). Por lo tanto, las inmunoglobulinas conjugadas divulgadas incluyen cualquiera de las inmunoglobulinas divulgadas precedentemente conjugadas con la auristatina F (conjugado AuF-T135K).

Composiciones farmacéuticas

[00192] En la presente también se proveen composiciones farmacéuticas. En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas pueden comprender cualquiera de las inmunoglobulinas divulgadas en la presente. En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas pueden comprender cualquiera de las inmunoglobulinas conjugadas que se divulgan en la presente. En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende la inmunoglobulina conjugada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Moléculas de ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas conjugables y células huésped que comprenden las mismas

[00193] En la presente también se proveen moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las inmunoglobulinas conjugables, o porciones de unión al antígeno de las mismas, que se divulgan en la presente. A modo de ejemplo, en una forma de realización, la molécula de ácido nucleico codifica una inmunoglobulina conjugable que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena liviana y en donde la inmunoglobulina conjugable codificada comprende un residuo lisina modificado, y en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina. El residuo lisina modificado de la inmunoglobulina o porciones de unión al antígeno de las mismas, está conjugado con el residuo glutamina de un sustrato donante de acilo, generando de esa manera la inmunoglobulina conjugada.

[00194] También se divulgan células huésped que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico o plásmidos divulgados que codifican la inmunoglobulina conjugable, o porciones de unión al antígeno de las mismas. Las células huésped adecuadas incluyen, pero en un sentido no taxativo, células de mamífero, células bacterianas, células de levadura, células de insecto, por nombrar

unos pocos.

[00195] Los siguientes ejemplos se proveen a fin de describir algunas de las formas de realización que se divulgan en la presente. Los ejemplos pretenden ilustrar, y no limitar, las formas de realización divulgadas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Mutagénesis dirigida al sitio

[00196] Las mutaciones se generaron usando QuikChange XL de Stratagene de acuerdo con el protocolo del proveedor. Las mutaciones deseadas se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

Mutagénesis de supresión

[00197] Se elaboraron fragmentos HC para la expresión de Fab mediante PCR, amplificando la secuencia directriz de HC por la bisagra que terminaba en varios codones 3'. Los fragmentos de la PCR se clonaron en un plásmido de expresión de mamífero basado en pcDNA3.1 usando un kit de clonación de HD In-Fusion de acuerdo con el protocolo del proveedor (CLONTECH).

Transfección y generación de líneas celulares estables

[00198] Por cada mililitro de células a transfectar con ExpiFectamina, se incubaron 333,3 ng de plásmido HC y 333,3 ng de plásmido LC durante 5-10 min en 50 µl de Opti-MEM (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Asimismo, se hizo contacto de 2,67 µl de ExpiFectamina en 50 µl de Opti-MEM. La solución de ExpiFectamina se agregó a la mezcla de ADN y se incubó durante 20-30 min a temperatura ambiente. Se agregó una mezcla de ADN:ExpiFectamina a las células bajo agitación suave y se incubaron a 37 °C, con 8% de CO₂, agitación a 125 rpm. Al día siguiente, se agregaron 5 µl de potenciador 1 y 50 µl de potenciador 2 por ml de células a la transfección continuándose con la incubación por otros 7-10 días.

[00199] Se seleccionaron las agrupaciones estables que expresan el

anticuerpo mediante adición de 1 ml de transfectantes a 14 ml de DMEM en un recipiente T75 con blasticidina 5 µg/ml y zeocina 400 µg/ml (Invivogen, San Diego, CA) uno a tres días después de la transfección. Después que las células resistentes al fármaco habían crecido hasta confluencia, se reemplazó el medio por medio de expresión FreeStyle 293 durante 24 a 48 h. Las células se desprendieron físicamente golpeando el frasco (la tripsinización dio como resultado una baja viabilidad, no se muestran los datos) y luego se sembraron a razón de 6×10^5 células/ml en 30 ml de medio de expresión FreeStyle 293 en un frasco de agitación de 125 ml. Los cultivos se incubaron a 37 °C en 8% de CO₂ con agitación a 125 rpm.

Producción de mAb y Fab

[00200] Las agrupaciones de líneas celulares transfectadas de manera estable se sembraron a razón de 0,6 a 1×10^6 células/ml en medio de expresión FreeStyle 293. Las células se incubaron a 37 °C, 8% de CO₂, agitación a 125 rpm. Dos días después que el cultivo alcanzó una densidad de 1×10^6 células/ml, los cultivos se alimentaron con concentraciones finales de Select Soytone (BD Biosciences, San Jose, CA) 10 g/l, ácido valérico 5 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y concentrado de lípidos CD 1:100 (ThermoFisher, Waltham, MA). Cuando la viabilidad celular era menor que un 50% (7-10 días), los cultivos se centrifugaron durante 1 h a 8000 rpm en un rotor Beckman JLA8.1000. Luego se filtró el sobrenadante a través de un filtro PES de 0,2 µm y se guardó a 4 °C o -20 °C hasta su purificación.

Purificación de mAb y Fab

[00201] Los mAb se purificaron usando uno de dos métodos. Para sobrenadantes de mAb y Fab de menos de 10 ml, se empleó cromatografía de afinidad usando un método de purificación por lotes con una resina de proteína A o resina anti-kappa, respectivamente. Los sobrenadantes de mAb y Fab mayores de

25 ml se purificaron usando columnas de proteína A o anti-kappa preempaquetadas, respectivamente.

Purificación por lotes

[00202] Se equilibró una resina de Proteína A de gran capacidad Prosep-
vA (Millipore, Billerica, MA) con DPBS, y se agregaron 100 µl a entre 3 y 6 ml de
muestra. Después de una incubación a 4 °C por entre 1 hora y toda la noche, la
resina se lavó tres veces con 1 ml de DPBS y se centrifugó a 18.000 x *g* durante 30
s. La muestra se eluyó de la resina mediante adición de 400 µl de glicina 0,1 M, pH
2,9, seguido por centrifugación a 18.000 x *g* durante 30 s. La muestra se neutralizó
con 40 µl de Tris 1 M, pH 8,0. La solución amortiguadora se intercambió usando
0,5 ml de filtros de corte 10k Amicon Ultra (Millipore, Billerica, MA) mediante
concentración de la muestra hasta ~ 100 µl por centrifugación a 18,000 x *g* durante
3 a 5 minutos. La muestra concentrada se diluyó en 400 µl de DPBS, seguido por
centrifugación. El proceso se repitió por un total de cuatro veces.

Purificación de la columna

[00203] Se equilibró una columna de proteína A o HiTrap KappaSelect (GE
Healthcare, Little Chalfont, RU) con 10 volúmenes de columna (CV) de fosfato de
sodio 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7,2. Luego se cargó la muestra, seguido por lavado
del material no unido con 10 CV de solución amortiguadora de equilibrio. La
muestra se eluyó usando 5 CV de glicina 0,1 M, pH 2,9. Se agruparon las fracciones
que contienen los mAb y se dializaron en DPBS usando un equipo MWCO 20K
Slide-A-Lyzer (ThermoFisher, Waltham, MA).

Síntesis del sustrato Z-Gln-Gly

[00204] El sustrato Z-Gln-Gly-OH se obtuvo de Bachem y el sustrato Z-
Gln-Gly-CAD-biotina se obtuvo de ZEDIRA (Figura 2).

Z-Gln-Gly-pentafluorofenil éster (Z-Gln-Gly-PFP)

[00205] La síntesis se realizó como describió Pasternack (Pasternack et

al., 1997), con modificaciones (Figura 3). Se disolvieron Z-Gln-Gly (328,8 mg, 0,975 mmol) y pentafluorofenol (Sigma, 183,3 mg, 0,996 mmol) en 10 ml de *N,N'*-dimetilformamida (DMF). Luego se agregó EDAC-HCl (Sigma, 201 mg, 1,04 mmol) y la reacción se incubó a temperatura ambiente bajo N₂ durante 2 h. Se agregaron 100 ml de éter dietílico frío a la reacción y se precipitó durante la noche a -80 °C. El producto crudo se recolectó mediante centrifugación y se recrystalizó a partir de 20 ml de metanol a 60 °C. El producto final se lavó con éter dietílico frío y se secó sobre un flujo de N₂. El rendimiento final era de 219,04 mg (44,7%). Espectrometría de masa-ionización por electroatomización (ESI-MS) (infusión directa en 50% de acetonitrilo en 0,1% de ácido fórmico) m/z 504,0 ([M+H], 86%), 526,0 ([M+Na], 100%), 542,0 ([M+K], 22%).

Z-Gln-Gly-propilazida (Z-Gln-Gly-N₃)

[00206] Se disolvieron Z-Gln-Gly-PFP (21,24 mg, 4,22 x 10⁻⁵ mol) y azidopropilamina (Click Chemistry Tools, 42,2 µl de una solución madre 0,91 M en DMF, 3,84 x 10⁻⁵ mol) en 0,42 ml de volumen final de DMF. La reacción se agitó bajo N₂ durante la noche a temperatura ambiente. El producto se purificó mediante HPLC usando 0,1% de ácido fórmico en H₂O/0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo como fase móvil. El producto se secó *in vacuo*. El rendimiento final era de 10,7 mg (60,4%). ESI-MS (purificación en gradiente) m/z 420,2 ([M+H], 100%), 442,1 ([M+Na], 32%).

Z-Gln-Gly-PEG₂-biciclononino (Z-Gln-Gly-PEG₂-BCN)

[00207] Se disolvieron Z-Gln-Gly-PFP (18,4 mg, 3,66 x 10⁻⁵ mol) y N-[(1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetiloxycarbonil]-1,8-diamino-3,6-dioxooctano (Sigma Aldrich) en 0,37 ml de volumen final de DMF. La reacción se agitó bajo N₂ durante la noche a temperatura ambiente. El producto se purificó mediante HPLC usando 0,1% de ácido fórmico en H₂O/0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo como fase móvil. El producto se secó *in vacuo*. El rendimiento final era de 0,6 mg (2%).

ESI-MS (purificación en gradiente) m/z 688,2 ([M+H], 100%), 710,2 ([M+Na], 69%).

Z-Gln-Gly-PEG₂-auristatina F (Z-Gln-Gly-PEG₂-AuF)

[00208] Se disolvió Z-Gln-Gly-PFP (22,2 mg, $4,37 \times 10^{-5}$ mol) en 0,85 ml de DMF y se agregó 1,2-etilendiamina ($2,3 \times 10^{-5}$ l, $3,5 \times 10^{-4}$ mol) y se mezcló. La reacción se agitó bajo N₂ durante la noche a temperatura ambiente. El producto se purificó mediante HPLC usando 0,1% de ácido fórmico en H₂O/0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo como fase móvil. El producto se secó *in vacuo*. El rendimiento final de Z-Gln-Gly-NH₂ era de 3,8 mg (23%). ESI-MS (purificación en gradiente) m/z 380,1 ([M+H], 100%). Se disolvieron Z-Gln-Gly-NH₂ (3,8 mg, $1,01 \times 10^{-5}$ mol) y NHS-PEG₂-AuF (10,3 mg, $1,03 \times 10^{-5}$ mol) en 0,2 ml de DMF. Se agregó trietilamina (14 µl, 1×10^{-4} mol) y la reacción se incubó bajo N₂ durante la noche a temperatura ambiente. La mitad de la reacción se purificó mediante HPLC usando 0,1% de ácido fórmico en H₂O/0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo como fase móvil. El producto se secó *in vacuo*. El rendimiento final de CBZ-Gln-Gly-PEG₂-AuF era de 3,8 mg (60%). ESI-MS (purificación en gradiente) m/z 634,0 ([M+H]²⁺, 100%), 645,1 ([M+Na]²⁺, 45%). 1267,0 ([M+H], 16%).

Reacción con la transglutaminasa microbiana

[00209] Se pusieron mAb, a un rango de concentraciones de entre 100 µg/ml y 2,5 mg/ml, en contacto con 785 µM de Z-Gln-Gly-biotina (Zedira, Darmstadt, Alemania), Z-Gln-Gly-N₃, Z-Gln-Gly-BCN o Z-Gln-Gly-PEG₂-AuF con 1 U/ml de transglutaminasa microbiana (Zedira, Darmstadt, Alemania) en DPBS durante al menos 16 h a 37 °C.

Ensayo con mTGasa de alto rendimiento

[00210] Se incubaron mAb a concentraciones que variaban en un rango entre 500 ng/ml y 10 µg/ml con Z-Gln-Gly-biotina 60 µM y 0,1 U/ml de mTGasa (Zedira) en DPBS durante por lo menos 16 h a 37 °C. Se recubrió una placa de 96 pocillos con 1 µg/ml del mAb Fcγ IgG de cabra anti-humana (Jackson

ImmunoResearch) durante la noche a 4 °C. Después de lavar la placa, las reacciones de mTGasa de la noche se diluyeron 1:10 en 50 µl de DPBS, se agregaron a la placa y se incubaron durante 1 h a 22 °C. A continuación, la placa se lavó y se agregaron 0,1 µg/ml de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch) a los pocillos. La placa se lavó nuevamente y se cuantificaron las muestras biotiniladas unidas a estreptavidina-HRP en unidades fluorescentes relativas (RFU) usando el sustrato QuantaBlue (Thermo) de acuerdo con el protocolo del proveedor.

Análisis mediante cromatografía líquida de ultra presión (UPLC)/ESI-MS de la conjugación del mAb

[00211] Se diluyeron anticuerpos purificados a 1 mg/ml en DPBS (si era inferior a 1,0 mg/ml las muestras se dejaron a la concentración original). Las reacciones que contienen dimetilsulfóxido (DMSO) se desalaron usando una columna de desalado Spin Zeba. Luego los mAb se deglicosilaron usando PNGasa F (NEB) o bien se digirieron en fragmentos Fab'₂ y Fc mediante IdeS (Promega). Para desglicosilar a los mAb, se agregaron solución amortiguadora G7 (5 ó 10 µl) y PNGasa F (1 ó 2 µl) al mAb (50 ó 100 µl). La reacción se incubó en un microondas Discover (CEM) durante 2 ciclos: 1.) potencia del microondas a 10 W, 37 °C, 10 min, y luego una pausa de 3-5 min; 2.) potencia del microondas a 2 W, 37 °C, 10 min. Se redujo una porción de la muestra deglicosilada mediante adición de ditiotreitól (DTT) a una concentración final de 20 mM, seguido por incubación a 60 °C durante 3 min. Para generar los fragmentos Fab'₂ y Fc, se agregaron 50 U/µl de IdeS a 0,5 mg/ml de mAb y se incubaron a 37 °C durante 0,5-1 h. Las muestras de IdeS se redujeron o no.

[00212] Luego se analizaron las muestras usando un espectrómetro de masa Waters Acquity UPLC y Q-T de Premier. Las muestras (0,5-2 µg de cada una) se inyectaron en una microcolumna de desalado MassPrep a 65 °C, se eluyeron de

la columna con 5 min de equilibrio en 95% de fase móvil A, un gradiente por 10 min (5-90% de B) y nuevo equilibrio por 10 min en 95% de fase móvil A, a 0,05 ml/min. La fase móvil A era 0,1% de ácido fórmico en agua. La fase móvil B era 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo. El espectrómetro de masa Q-Tof se corrió en la modalidad V, ion positivo, con detección en el rango de 500-4000 m/z. Los parámetros de la fuente fueron: voltaje capilar, 2,25 kV (anticuerpo intacto)-2,50 kV (anticuerpo reducido); voltaje del cono de muestreo, 65,0 V (anticuerpo intacto) o 50,0 V (anticuerpo reducido); temperatura de la fuente, 100 °C; temperatura de desolvatación, 250 °C; flujo gaseoso de desolvatación, 550 l/h. El pico de proteína se desarrolló usando la función MassLynx MaxEnt 1.

Cromatografía líquida de fase reversa (LC)-MS

[00213] Las muestras se analizaron usando cromatografía líquida de fase reversa. Las muestras que contienen 100 µl de ADC a la concentración de 1-2 mg/ml se redujeron con DTT 20 mM a 60 °C durante 3 minutos. Las muestras se analizaron usando HPLC Waters Alliance con detectores SQD y PDA. Cada muestra se inyectó en una columna Proteomix RP-1000 (5 µ, 4,6 X 150 mm, Sepax) a 65 °C. Para los mutantes LC y HC, la separación de LC y HC se realizó con 3,0 min de equilibrio en 75% de fase móvil A (0,1% de TFA en agua) y un gradiente de 27 minutos (25-55% de fase móvil B [0,1% de TFA en agua]) a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

[00214] El espectrómetro de masa SQD se corrió en la modalidad V, ion positivo, con detección en el rango de 200-2.000 m/z. Los parámetros de la fuente fueron: voltaje capilar, 3,20kV; voltaje del cono de muestreo, 40 °C; temperatura de la fuente, 150°C; temperatura de desolvatación, 250 °C; flujo gaseoso de desolvatación, 700 l/h. Tiempo de barrido, 1 segundo. El pico de proteína se desarrolló mediante la función MassLynx MaxEnt 1. El detector PDA se encontraba a 280 nm.

[00215] La DAR se calculó basado en la intensidad de señal relativa de la LC no conjugada y conjugada y HC no conjugada y conjugada. La DAR total se calculó usando la siguiente ecuación: $DAR\ total = (DAR\ LC + DAR\ HC) \times 2$.

Ejemplo 2: Análisis de las lisinas expuestas al solvente sobre anticuerpos IgG

[0001] A fin de estudiar la disponibilidad de lisinas expuestas al solvente sobre anticuerpos IgG, se examinaron las estructuras cristalinas de un Fab IgG1-kappa (4F3F), un Fab IgG1-lambda (4HK0) y Fc IgG1 (1FC1) por potenciales sitios aceptores de acilo. Dado que la mTGasa tiende a preferir las glutaminas y lisinas del sustrato expuestas al solvente dentro de bucles (Spolaore, 2012), se resaltaron las lisinas expuestas al solvente usando Discovery Studio v4.5 con un radio de sonda de 1,4 Å (Figura 4). Hay 7 lisinas expuestas al solvente en el anticuerpo 01 VH con 3 en giros o bucles. Ya que la cantidad de lisinas puede variar entre mAb debido a la utilización de diferentes familias de regiones variables de línea germinal e hipermutación somática, también se analizó la exposición al solvente de las lisinas en la región VH de otros cinco anticuerpos basado en posiciones análogas de los residuos en la estructura 4F3F. Estas regiones VH contienen potencialmente 1-5 lisinas expuestas al solvente con 1 ó 2 presentes en un giro o bucle. En el anticuerpo 01 V_k hay 6 lisinas expuestas al solvente y 4 se encuentran en bucles o giros. Las regiones V_K de otros cuatro anticuerpos contienen potencialmente 3 a 5 lisinas expuestas al solvente con 2 en un bucle o giro. El anticuerpo 05 utiliza una cadena lambda, y la exposición al solvente de la lisinas se determinó usando la estructura cristalina de 4HK0 basado en la similitud de secuencia de la cadena liviana. El anticuerpo 05 tiene potencialmente 2 lisinas expuestas al solvente en el dominio V_λ y solamente 1 en un bucle. Los dominios constantes de la IgG₁ tienen 23 lisinas expuestas al solvente con 13 en bucles o giros

(Figura 6). La región constante kappa tiene 8 lisinas con 5 en un giro o bucle. La región lambda tiene 6 lisinas expuestas al solvente con la mitad en bucles o giros. En total, los anticuerpos analizados presentaron un rango entre 42 y 50 lisinas expuestas al solvente en bucles o giros por mAb.

[0002] Para determinar si la transglutaminasa microbiana puede transamidar un residuo lisina nativo sobre un anticuerpo IgG, los anticuerpos se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y mTGasa a 37 °C durante la noche. Las muestras se digirieron con IdeS y se redujeron con DTT, y las masas de los fragmentos LC, Fd y Fc se analizaron mediante espectrometría de masa. Se observaron dos picos de masa correspondientes a las glicoformas G0F (+1445 Da) y G1F (+1608 Da) por cada Fc. El anticuerpo 04 también contenía un sitio de glicosilación N-ligado en VH y se observaron dos especies de glicano, los glicanos G2FS y G2FS2. Todas las muestras carecían de una lisina C-terminal (128 Da), como lo demuestra la diferencia de -130 a -132 Da entre la masa observada y la masa teórica para el Fc. Aunque hay 42-50 potenciales lisinas aceptoras de acilo en los diferentes anticuerpos, sorprendentemente ni HC o LC fueron modificados por el sustrato donante de acilo (Figura 7, Tabla 1).

Tabla 1: Análisis mediante ESI-MS de anticuerpos en contacto con un donante de acilo y una transglutaminasa microbiana

ZQG-CAD-biotina: +631 Da

	LC			Fd				Fc			
	Calcula do	Observ ado	ΔMa sa	Calcula do	Observ ado	Glica no	ΔMa sa	Calcula do	Glica no	Observ ado	ΔMa sa
Anticuerpo 02	23751	23750	-1	25073	25071		-2	25328 25491	G0F G1F	25198 25360	-130 -131
Anticuerpo 03	23478	23478	0	26097	26097		0	25388 25551	G0F G1F	25258 25420	-130 -131
Anticuerpo 01	23216	23213	-3	25072	25069		-3	25328 25491	G0F G1F	25198 25359	-130 -132
Anticuerpo 04	23532	23530	-2	27566 27857	27564 27855	G2F S G2F	-2 -2	25296 25459	G0F G1F	25166 25327	-130 -132

	S2									
Anticuerpo 05	22655	22653	-2	26340	26337	-3	25328	G0F	25198	-130
							25491	G1F	25360	-131
Anticuerpo 06	23472	23470	-2	25383	25381	-2	25328	G0F	25198	-130
							25491	G1F	25359	-132

Tabla 1: Las masas de LC, Fd y Fc se determinaron mediante ESI-MS. La masa teórica de cada fragmento se determinó mediante la secuencia de aminoácidos restada de la masa observada para determinar el cambio en la masa (Δ masa). Un Δ masa de -128 Da se debe al clivaje de Lys447. El Fc está glicosilado con uno o dos oligosacáridos, G0F o G1F.

Ejemplo 3: Mutación de residuos de aminoácidos naturales en lisina para crear un sitio aceptor de acilo

[0003] Dado que no hay sitios aceptores de acilo en los mAb IgG1 humanos, se realizó una mutagénesis por barrido con lisina con el Anticuerpo 01 para identificar las regiones que podían ser modificadas para introducir uno o más sitios aceptores de acilo. Con el fin de aumentar las probabilidades de identificar nuevos sitios aceptores de acilo, la mutagénesis se limitó a los residuos expuestos al solvente dentro de los bucles o giros de las regiones constantes de la HC de IgG1 humana y las LC kappa y lambda (Figura 6). Los mAb mutantes fueron examinados inicialmente por la transamidación usando un ensayo basado en ELISA mediante incubación de los mutantes con mTGasa y Z-Gln-Gly-CAD-biotina durante la noche a 37 °C. Los mAb se capturaron sobre una placa recubierta con anti-Fc γ y los mAb biotinilados se detectaron mediante estreptavidina conjugada con HRP. Se incluyeron el Anticuerpo 01 de tipo salvaje y el Anticuerpo 01-L (que está transamidado en Lys447) como controles negativos y positivos, respectivamente. La señal para el Anticuerpo 01-L de control positivo era mayor que 12.000 RFU y para los mAb mutantes variaba en un rango de entre ~1100 RFU y ~11,000 RFU (Figura 7).

[0004] La transamidación de todos los CH1 y mutantes de la bisagra superior con Z-Gln-Gly se analizó mediante ESI-MS para determinar si el porcentaje de conjugación se correlaciona con la señal RFU observada en el ensayo ELISA. Las muestras se incubaron con mTGasa y Z-Gln-Gly durante la noche a 37 °C, y se analizaron sus masas mediante ESI-MS. La señal RFU del ELISA se correlacionaba mayormente con los datos de ESI-MS, donde valores de RFU mayores que 7000 correspondían a >70% de conjugación de los mutantes S136K, D221K, T223K y H224K (Figura 7). La señal RFU para T135K y T225K era menor que 7000, pero dichos mutantes estaban entre un 80,4% y un 100% conjugados, respectivamente. Por el contrario, el mutante G137K tenía un valor de RFU de 8616, pero solo estaba un 38,9% conjugado. Por ello, en tanto una señal RFU >7000 correspondía a un alto porcentaje de transamidación, hubo unos pocos falsos positivos y falsos negativos. En lugar de conducir un examen con ESI-MS de bajo rendimiento de los mutantes remanentes, se usó un corte de >4000 RFU para recolectar muestras de CH2 y CH3 para su análisis. Dado que solamente dos muestras kappa y ninguna lambda eran mayores que 4000 RFU, también se analizaron muestras mayores que 3000 RFU.

[0005] La reacción de transamidación se realizó mediante incubación de Z-Gln-Gly-CAD-biotina y mTGasa durante la noche a 37 °C con los mutantes de CH2 M252K, E283K, A287K y N297K; los mutantes CH3 P343K, G385K, G420K, H433K, L443K, S444K y P445K; los mutantes kappa D151K, L201K, S202K y E213K; y los mutantes lambda V147K, Q187K y E213K, y subsiguiente análisis con ESI-MS (Figura 7). Se analizaron tres mutantes de CH1 adicionales, S191K, S192K y L193K, con ESI-MS, pero no se incluyeron en el examen con ELISA inicial. Entre estos mutantes, el mutante L193K de CH1, el mutante M252K de CH2, el mutante P445K de CH3, los mutantes L201K y S202K de kappa, y el mutante E213K de lambda estaban más de un 70% conjugados (Figura 7). Los resultados para el

mutante N297K de CH2 no fueron concluyentes debido a una señal muy baja.

[0006] Los mutantes identificados por tener la mayor eficacia de conjugación se volvieron a analizar en un solo experimento usando el sustrato de Z-Gln-Gly-CAD-biotina. La región de conjugación se confirmó mediante digestión de las muestras con IdeS y reducción antes del análisis con ESI-MS para generar fragmentos Fd (CH1 y bisagra), Fc (CH2 y CH3) y LC. Nuevamente, la conjugación con N297K no era concluyente debido a una baja señal de Fc a pesar de las señales altas de Fd y LC. La transamidación de muestras se correlacionaba en todos los casos con el dominio que contiene la mutación de lisina. Los mutantes de T135K y P445K se conjugaron a 100%, y la conjugación con M252K era cercana al 100% (Figura 8). Las mutaciones S136K y S221K se habían conjugado en más de un 80%. Los otros tres mutantes de bisagra presentaban eficiencias de conjugación menores que un 50%. Ambos mutantes LC se habían conjugado en más de un 80%.

Ejemplo 4: Inserción de un residuo lisina para crear un sitio aceptor de acilo

[0007] Los residuos Ser190 a Thr195 forman un giro beta que conecta las hebras E y F. El barrido con lisina por esta área expuesta solamente mostró un sitio – en la posición 193 – como un sitio donante de acilo aceptable. Esta región forma una hélice alfa, y era posible que esta estructura secundaria impidiera la transamidación en esta región. A fin de interrumpir potencialmente la estructura en esta región, se insertó una lisina entre Ser191 y Ser192, entre Ser192 y Leu193 o entre Leu193 y Gly194. Las muestras se incubaron con mTGasa y Z-Gln-Gly-CAD-biotina durante la noche a 37 °C, y sus masas se analizaron mediante ESI-MS. La inserción de una lisina entre Ser191 y Ser192 o entre Ser192 y Leu193 se transamidó en un 100%, pero no cuando se insertaba entre Leu193 y Gly194 (Tabla 2).

Tabla 2: Transamidación de una lisina insertada

Z-Gln-Gly-CAD-biotina: +631Da

	Secuencia	Calculado	Observado	Δ Masa	% conjugado
S191.K.S19 2	SSKSLGT	48937	49565	628	100,0%
S192.K.L19 3	SSSKLGT	48937	49565	628	100,0%
L193.K.G19 4	SSSLKGT	48937	48934	-3	0,0%

Los mAb se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una mTGasa durante la noche a 37 °C. Las masas de los mAb reducidos se analizaron mediante ESI-MS (no se muestran los datos) y el porcentaje de conjugación con Z-Gln-Gly-CAD-biotina (Δ masa = 631 Da) se determinó igual que antes. La DAR se determinó dividiendo la Δ masa por la masa de Z-Gln-Gly-CAD-biotina.

Ejemplo 5: Transamidación resultante de la adición de una lisina al extreme C-terminal de LC

[0008] Se había demostrado previamente que el residuo Lys447 C-terminal de la HC es un sitio de transamidación cuando el clivaje de Lys447 es bloqueado por un residuo C-terminal adicional en la posición 448, véase la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/269.138, presentada el 18 de diciembre, 2015, y PCT/US2016/067165 presentada el 16 de diciembre, 2016, cuyos contenidos completados de cada de uno se incorpora expresamente en la presente a modo de referencia. Se modificó una lisina en el extremo C-terminal de la LC para determinar si la extensión con una sola lisina C-terminal es suficiente para actuar como un sitio aceptor de acilo. A diferencia de la lisina C-terminal nativa en la HC, una lisina C-terminal sobre la LC no era clivada por una carboxipeptidasa (Tabla 3). Sin embargo, esta lisina modificada no era un sitio aceptor de acilo. Una modificación de adición de una leucina adicional en el extremo C-terminal de la lisina modificada (LC-KL), como un motivo Lys-Leu en el extremo C-terminal de la HC, es transamidada eficazmente. Sin embargo, la LC-KL no era transamidada. La

cisteína C-terminal nativa (Cys214) en la LC forma un enlace disulfuro entre cadenas con la HC, y esta región está enterrada en las estructuras cristalinas de esta región (no se muestran los datos). Podría ser que un impedimento estérico o la falta de exposición al solvente impida la transamidación. Se agregó una sola leucina entre Cys214 y la lisina en un intento por hacer que la lisina sea más accesible a la MTGasa. Nuevamente, no se observó clivaje para la lisina C-terminal, y no se observó transamidación del motivo LK. Sin embargo, el 9,1% de las LC con el motivo LKL era transamidado. Para extender la lisina alejándola de la interfase LC-HC, se insertó un conector Gly-Ser entre Cys214 y la lisina. Esta extensión dio como resultado el clivaje de una lisina C-terminal (GGSGK). A protección del clivaje de la lisina mediante adición de una leucina C-terminal (GGSGKL) dio como resultado LC con un 77,8% de transamidación.

Tabla 3: Transamidación de una adición C-terminal de una lisina a la LC
Z-Gln-Gly-CAD-biotina: +631Da

	Calculado	Observado	Δ Masa	% conjugado
Anticuerpo 01-LC-K	23340	23343	3	0,0%
	23340	23344	4	
Anticuerpo 01-LC-KL	23453	23457	4	0,0%
Anticuerpo 01-LC-LK	23453	23457	4	0,0%
Anticuerpo 01-LC-LKL	23566	23569	3	9,1%
	23566	23570	4	
	23566	24201	635	
Anticuerpo 01-LC-GGSGK	23598	23473	-125	0,0%
	23598	23474	-124	
Anticuerpo 01-LC-GGSGKL	23711	23714	3	77,8%
	23711	24345	634	

Los mAb se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una mTGasa durante la noche a 37 °C. Las masas de las LC reducidas se analizaron mediante ESI-MS y se determinó el porcentaje de conjugación con Z-Gln-Gly-CAD-biotina (Δ masa = 631 Da) como en la (Tabla 1).

Ejemplo 6: Análisis de donantes de acilo adicionales

[0009] Una utilidad de las conjugaciones con un aceptor de acilo sobre un mAb es en la elaboración de ADC específicos del sitio. La conjugación de los agentes funcionales con un mAb se podría efectuar mediante uno de dos métodos. Primero, un método de 2 pasos requeriría la conjugación por mTGasa de una lisina con un donante de acilo que tiene un grupo reactivo, tal como BCN, DBCO, TCO, azido (N_3), alquino, tetrazina o maleimida. El segundo paso comprende la conjugación de un agente funcional con el grupo reactivo usando, por ejemplo, una química click sin cobre o una química tiol reactiva. Z-Gln-Gly- N_3 no se encuentra disponible comercialmente; por ello se agregó aminopropil- N_3 al grupo hidroxilo de Z-Gln-Gly como se describió en la sección de Métodos. Se incubó el Anticuerpo 01 que tiene mutaciones de lisina en HC o LC con Z-Gln-Gly- N_3 o Z-Gln-Gly-PEG₂-BCN y mTGasa igual que antes. Las muestras se desalaron y analizaron mediante LC-MS para determinar la adición del sustrato al mAb. Se agregó eficazmente Z-Gln-Gly- N_3 (>75% de conjugación o DAR 1,5) para la mayoría de las sustituciones con lisina (Tabla 4). Los sitios de transamidación más permisibles fueron HC-S135K, HC-L193K, HC-D221K, HC-M252K, HC-N297K, HC-P445K y LC-L201K. Todos los mutantes HC-T136K, HC-T223K, HC-T225K, LC-S202K y LC-GGSGKL están transamidadas en >75% con Z-Gln-Gly-CAD-biotina (Figura 7), pero no con Z-Gln-Gly- N_3 . Por ello, no todos los donantes de acilo eran transamidados igualmente en el mismo sitio aceptor de acilo. Esto también lo demostró Z-Gln-Gly-PEG₂-BCN, donde no se había transamidado eficazmente ningún sitio aceptor de acilo (Tabla 4). Contrario a Z-Gln-Gly- N_3 , el porcentaje de transamidación por Z-Gln-Gly-PEG₂-BCN no varió ampliamente entre los sitios aceptores de acilo. Por ejemplo, había un 32% de diferencia en transamidación de T135K y S136K por Z-Gln-Gly- N_3 , pero solamente un 4% de diferencia con Z-Gln-Gly-PEG₂-BCN.

Tabla 4: Transamidación con varios donantes de acilo

Mutación de HC	Z-Gln-Gly-N3	Z-Gln-Gly-PEG2-BCN	Z-Gln-Gly-PEG2-AuF	Especies de DAR
T135K	89,1%	27,1%	51,4%	1
S136K	59,6%	23,1%	16,1%	1
L193K	81,5%	63,7%	23,3%	1
D221K	55,1%	31,5%	39,7%	1
	8,5%			2
T223K	48,7%	0,0%	ND	1
H224K	55,7%	17,3%	ND	1
T225K	34,1%	0,0%	ND	1
M252K	89,0%	15,6%	82,8%	1
N297K	27,6%	6,0%	46,5%	1
	41,3%	0,0%	30,4%	2
	23,7%	0,0%	4,5%	3
P445K	73,0%	49,6%	48,7%	1

Mutación de LC	Z-Gln-Gly-N3	Z-Gln-Gly-PEG2-BCN	Z-Gln-Gly-PEG2-AuF	DAR
L201K	100,0%	52,5%	92,0%	1
S202K	58,5%	0,0%	44,5%	1
GGSGKL	69,5%	0,0%	44,5%	1

Los mAb se incubaron con Z-Gln-Gly-N3, Z-Gln-Gly-PEG2-BCN o Z-Gln-Gly-PEG2-AuF y mTGasa a 37 °C durante la noche. Las masas de los mAb reducidos se analizaron mediante LC-MS (no se muestran los datos), y el porcentaje de conjugación con Z-Gln-Gly-CAD-biotina (Δ masa = 631 Da) se determinó como en la (Tabla 1).

[0010] Notablemente, la conjugación con D221K y N297K dio como resultado múltiples sitios de conjugación en la HC. La mutación D221K es adyacente a Lys222, que no es típicamente un sitio aceptor de acilo. Quizás la presencia de una lisina adyacente facilita un nivel bajo de transamidación de Lys222. Se debe notar que solo el sustrato Z-Gln-Gly-N₃ está conjugado en más de un sitio en el mutante D221K. La estructura de Z-Gln-Gly-N₃ es más pequeña que los demás sustratos evaluados (Figura 2), y es probable que el impedimento estérico del segundo sitio de conjugación bloquea su transamidación por los otros sustratos.

[0011] La mutación N297K elimina el sitio de glicosilación en Asn297. Los mAb aglicosilados adoptan una estructura diferente que las formas glicosiladas. La mutación N297Q también dio como resultado un mAb aglicosilado y afecta la estructura de una manera tal que el residuo Gln295 sea transamidada luego por una variedad de sustratos aceptores de acilo (Mindt, T.L. *et al.*, 2008, *Modification of different IgG1 antibodies via glutamine and lysine using bacterial and human tissue transglutaminase*, *Bioconjug. Chem* 19: 271-278; Jeger, S. *et al.*, 2010, *Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase*, *Angew. Chem Int Ed Engl* 49: 9995-9997; Dennler, P. *et al.*, 2014, *Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates*, *Bioconjug. Chem* 25: 569-578). Es probable que N297K cambia la confirmación de la región CH2 dando como resultado lisinas nativas que ahora se vuelven sitios aceptores de acilos para Z-Gln-Gly-N₃.

[0012] Un segundo método de conjugación comprende un solo paso de conjugación en el cual se sintetiza un agente funcional con un grupo donante de acilo. Este método se evaluó sintetizando un grupo Z-Gln-Gly sobre PEG2-auristatina F (Z-Gln-Gly-PEG2-AuF). El sustrato Z-Gln-Gly-PEG2-AuF se incubó con el Anticuerpo 01 HC y los mutantes de lisina LC y mTGasa durante la noche a 37 °C. Las muestras se desalaron y analizaron mediante LC-MS para determinar la adición del sustrato al mAb. Todos los mutantes HC evaluados demostraron cantidades variables de conjugación (Tabla 4). La eficacia de conjugación en determinados sitios no se correspondía con la eficacia de conjugación observada con Z-Gln-Gly-N₃. La conjugación con Z-Gln-Gly-PEG₂-AuF era baja para T135K, L193K y D221K pero alta para Z-Gln-Gly-N₃. L201K era el más eficiente, con un 92% de los LC conjugadas con Z-Gln-Gly-PEG₂-AuF. Nuevamente, N297K mostró múltiples sitios de conjugación, pero la eficacia no era tan alta como con Z-Gln-Gly-N₃.

Ejemplo 7: Generación de múltiples sitios aceptores de acilo sobre un solo anticuerpo

[0013] Un mAb mutante con uno sitio aceptor de acilo modificado da como resultado una DAR teórica de 2. Al combinar múltiples sitios aceptores de acilo modificados, la DAR teórica aumenta en 2 por cada sitio. Un aumento en la carga de fármaco de un ADC da como resultado el suministro de más fármacos citotóxicos a la célula blanco por mAb, lo cual puede permitir una dosificación menor al paciente. Para determinar si múltiples sitios aceptores de acilo podrían resultar en un mAb con una relación entre un agente funcional y una inmunoglobulina mayor que 2, los mAb se modificaron para incluir la mutante L201K o S202K de LC en combinación con las mutaciones T135K o S136K de CH1, las mutaciones S136K-N297K de CH1-CH2, las mutaciones S136K-N297K-P445K de CH1-CH2-CH3 o las mutaciones T135K-L448 de CH1-CH3 para obtener mAb con 4, 6, 8 ó 6 sitios aceptores de acilo, respectivamente.

[0014] Las muestras basadas en T135K se incubaron con mTGasa y Z-Gln-Gly-CAD-biotina durante la noche a 37 °C, y sus masas se analizaron mediante LC-MS después de una reducción. Las LC L201K se habían conjugado un 100% en todas las muestras (Tabla 5). La S202K de LC en el mutante T135KHC individual mostró más del doble de eficacia que el mutante doble T135K-L448HC (69,8% versus 31,8%). La T135K estaba un 100% conjugado cuando se combinaba solo con la mutación L201KLC, resultando en un DAR de 4,0. En combinación con la mutación S202KLC, la conjugación se redujo a un 88,7%, con un DAR promedio de 3,17. La combinación de la mutación T135K con L448HC resultó en un 100% de conjugación con los mAb. Sin embargo, la DAR era heterogénea con un 77,1% que contiene 2 biotinas por HC y 22,9% que contiene solo 1 biotina dando un DAR promedio de 3,54. Cuando se combinaban las mutaciones HC dobles con una mutación LC, caía la eficacia de la conjugación con la HC. La cantidad de especies

de DAR 1 fue de más del doble y las especies de DAR 2 cayeron entre 2,3 y 6,5 veces. A pesar que estos dos mAb tenían una DAR potencial de 6, la DAR promedio era menor que 4.

Tabla 5: La combinación de mutaciones de lisina dio como resultado múltiples sitios aceptores de acilo en un solo mAb

	% de conjugación de HC		% de conjugación de LC	DAR prom
	DAR 1	DAR 2	DAR 1	
Z-Gln-Gly-CAD-biotina				
T135KHC/L201KLC	100,0%	0,0%	100,0%	4,00
T135KHC/S202KLC	88,7%	0,0%	69,8%	3,17
T135K-L448HC	22,9%	77,1%	0,0%	3,54
T135K-L448HC/L201KLC	56,0%	11,9%	100,0%	3,59
T135K-L448HC/S202KLC	52,8%	33,2%	31,8%	3,02

	% de conjugación de CH1	% de conjugación de LC	DAR prom
	DAR 1	DAR 1	
S136KHC/S202KLC	85,5%	72,5%	3,16
S136K-N297KHC/S202KLC	88,1%	59,7%	2,95
S136K-N297K-P445KHC/S202KLC	84,5%	56,0%	2,80

Los mAb se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una mTGasa durante la noche a 37 °C. Las masas de los mutantes T135K reducidos se analizaron mediante LC-MS y el porcentaje de conjugación con Z-Gln-Gly-CAD-biotina (Δ masa = 631 Da) se determinó igual que antes. Los mAb mutantes con S136K se digirieron con IdeS, se redujeron y se analizaron mediante ESI-MS. La señal de los fragmentos Fc era demasiado baja como para poder analizarla.

[0015] Las muestras que contienen la mutación S136KHC se incubaron con mTGasa y Z-Gln-Gly-CAD-biotina durante la noche a 37 °C, y sus masas se analizaron mediante ESI-MS después de digestión y reducción con IdeS. La CH1 y

la cadena liviana de todas las muestras se habían transamidado (Tabla 5). S136K estaba conjugada entre un 84,5% y 88,1% en todas las muestras. La transamidación de S202K era mayor que en el mutante S136K individual versus los mutantes de HC dobles y triples (72,5% versus 56% o 59,7%). La DAR para S136KHC/S202KLC era de 3,16 de 4 sitios potenciales. La señal ESI-MS para los fragmentos Fc que contienen la mutación N297K era muy baja, y no se pudo determinar la eficacia de conjugación. Por ello, las DAR para los mutantes de HC dobles y triples eran por lo menos de 2,95 y 2,8.

[0016] También se examinó la transamidación de múltiples sitios por otro sustrato donante de acilos. Los mutantes basados en T135K con Z-Gln-Gly-N₃, Z-Gln-Gly-PEG₂-BCN o Z-Gln-Gly-PEG₂-AuF y mTGasa durante la noche a 37 °C. La conjugación con los sitios L201K y S202K de LC por cada uno de los sustratos era similar entre estos mAb de mutaciones múltiples y las mutaciones individuales L201K y S202K que se muestran en la Tabla 4, excepto que no se observó ninguna conjugación de Z-Gln-Gly-PEG₂-BCN con las mutaciones de LC (Figura 11). Los dos mutantes que contienen una sola mutación T135K más una sola mutación en LC demostraron una eficacia de conjugación con T135K similar a la T135K única en la Tabla 4 para todos los sustratos donantes de acilo. El agregado de la segunda mutación L448 dio como resultado mezclas de muestras con DAR 1 y DAR 2 para la HC. Las muestras transamidadas más eficazmente fueron T135KHC/L201KLC+Z-Gln-Gly-N₃ (DAR 3,57 de 4), T135K-L448HC+Z-Gln-Gly-N₃ (DAR 3,1 de 4) y T135K-L448HC/L201KLC+Z-Gln-Gly-N₃ (DAR 5,04 de 6).

Ejemplo 8: Análisis de las sustituciones de lisina en otros isotipos de IgG

[0017] Los Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 son un 89,2% idénticos (Figura 10, secuencia de alineamiento), por ello era posible que las inserciones o sustituciones de lisina en las posiciones en IgG2, IgG3 y IgG4 de manera análoga a IgG1 podrían ser sitios aceptores de acilo modificados para la mTGasa. Primero,

se analizaron las IgG2, IgG3 e IgG4 de tipo salvaje para determinar si hay algún sitio aceptor de acilo específico nativo para estos isotipos. Se incubaron mAb con mTGasa y Z-Gln-Gly-CAD-biotina durante la noche a 37 °C. Las muestras se digirieron con IdeS y las masas de los Fc se analizaron mediante ESI-MS. Al igual que con IgG1, no se observó transamidación con las IgG2, IgG3 o IgG4 de tipo salvaje (Tabla 6).

Tabla 6: IgG2, IgG3 e IgG4 no tienen sitios aceptores de acilo.
Z-Gln-Gly-CAD-biotina: +631Da

	Glicano	Calculado	Observado	Δ Masa	% conjugado
IgG2	G0F	25362	25232	-130	0,0%
	G1F	25525	25394	-131	
IgG3	G0F	25396	25266	-130	0,0%
	G1F	25559	25428	-131	
IgG4	G0F	25344	25214	-130	0,0%
	G1F	25507	25376	-131	

Los mAb se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y mTGasa a 37 °C durante la noche, seguido por digestión con IdeS para generar los fragmentos F(ab')₂ y Fc. Las masas de los fragmentos Fc generados con IdeS se analizaron mediante ESI-MS como antes, y se determinó el porcentaje de conjugación con Z-Gln-Gly-CAD-biotina (Δ masa=631 Da) como se divulga en la presente.

[0018] Se efectuaron sustituciones de lisina en las posiciones análogas de las IgG1 (M252, N297 y P445). Excepto por IgG4 que codifica una leucina en la posición 445, no hay diferencias en estos residuos entre los isotipos (Figura 10). Se incubaron los mAb mutantes con mTGasa y Z-Gln-Gly-CAD-biotina durante la noche a 37 °C. Las muestras se digirieron con IdeS y las masas de los Fc se analizaron mediante ESI-MS. Los mutantes N297K y M252K eran transamidados eficazmente con los mutantes N297K, dando más de un sitio de conjugación por HC al igual que con la IgG1 (Tabla 7). Ambos IgG2-N297K y IgG4-N297K contenía 2 sitios aceptores de acilo en tanto IgG3 contenía 3. El mutante P445K fue el único transamidado eficazmente para el isotipo IgG2. La transamidación de P445K solo

era del 62,6% y 50,6 para la IgG3 y la IgG4, respectivamente.

Tabla 7: Los sitios aceptores de acilo modificado en Fc IgG1 también eran sitios aceptores en IgG2, IgG3 e IgG4.
ZQG-CAD-biotina: 631 Da

	Calculado	Glicano	Observado	Δ Masa	% del total	% de conjugación
IgG2 N297K	23803	-	24434	631	78,6%	100,0%
			25059	1256	21,4%	
IgG3 N297K	23837	-	24468	631	28,2%	100,0%
			25099	1262	40,8%	
			25730	1893	31,0%	
IgG4 N297K	23785	-	24416	631	81,6%	100,0%
			25047	1262	18,4%	
IgG2 M252K	25231	G0F	25231	0	14,2%	85,8%
	25231	G0F	25862	631	69,5%	
	25394	G1F	26024	630	16,3%	
IgG3 M252K	25265	G0F	25265	0	7,4%	92,6%
	25265	G0F	25896	631	50,7%	
	25428	G1F	26058	630	41,9%	
IgG4 M252K	25213	G0F	25844	631	57,4%	100,0%
	25376	G1F	26006	630	42,6%	
IgG2 P445K	25265	G0F	25895	630	64,7%	100,0%
	25428	G1F	26058	630	35,3%	
IgG3 P445K	25299	G0F	25299	0	21,1%	61,6%
	25462	G1F	25461	-1	17,3%	
	25299	G0F	25930	631	34,3%	
	25462	G1F	26092	630	27,4%	
IgG4 L445K	25231	G0F	25231	0	25,7%	50,6%
	25394	G1F	25393	-1	23,7%	
	25231	G0F	25862	631	27,6%	
	25394	G1F	26024	630	23,0%	

Los mAb se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y mTGasa a 37 °C durante

la noche, seguido por digestión con IdeS para generar los fragmentos F(ab')₂ y Fc. Las masas de los fragmentos Fc generados con IdeS se analizaron mediante ESI-MS como antes, y se determinó el porcentaje de conjugación con Z-Gln-Gly-CAD-biotina (Δ masa=631 Da) como se divulga en la presente.

Ejemplo 9: Sitios de transamidación en la región Fab'

[0019] La bisagra de la IgG es un conector flexible entre CH1 y CH2, y por ende es posible que esta flexibilidad permitiría una transamidación de los aceptores de acilo en esta región. Zhang, *et al.*, *3D Structural Fluctuation of IgG1 Antibody Revealed by Individual Particle Electron Tomography*, *Sci Rep*, (2015) 5: 9803. Además, los mutantes de la bisagra superior, D221K, T223K, H224K y T225K, son transamidados eficazmente; sin embargo, no hubo transamidación de los mutantes de las bisagras media o inferior. Esta falta de transamidación se puede deber a restricciones estructurales de los enlaces disulfuro intercatenarios y la proximidad a CH2, respectivamente. Para determinar si estos residuos se pueden transamidar cuando eran liberados de cualquier restricción estructural, las mutaciones de lisina se efectuaban en el contexto de un Fab' que contiene toda la región bisagra con los residuos Cys226 y Cys229 mutados en alanina (DTHAPPAPPELL).

[0020] La transaminación de los Fab' mutantes se determinó mediante ESI-MS igual que antes usando Z-Gln-Gly-CAD-biotina como donante de acilo. Las masas de la porción HC del Fab' eran las esperadas excepto por el mutante L235K. Esta mutación da como resultado un residuo lisina C-terminal que se clivó, probablemente debido a la carboxipeptidasa B como con la IgG de longitud completa. Harris *et al.*, *Structural characterization of a recombinant CD4-IgG hybrid molecule*, *Eur J Biochem*, (1990) 194: 611-620; Harris, *Processing of C-terminal lysine and arginine residues of proteins isolated from mammalian cell culture*, *J Chromatogr. A*, (1995) 705: 129-134; Dick, Jr. *et al.*, *C-terminal lysine variants in fully human monoclonal antibodies: investigation of test methods and possible*

causes, Biotechnol. Bioeng., (2008) 100: 1132-1143. Si bien no se observó transamidación de la IgG de longitud completa, se vio una cantidad menor de transamidación (4,7%) en el Fab' de tipo salvaje, posiblemente en Lys222 (Figura 9). La mutagénesis por barrido de lisina del Fab' reveló varios sitios aceptores de acilo en las posiciones D221, T223, H224, T225, P230 y E233. Estos Fab' se transamidaron con 1 ó 2 biotinas, con una sobre la lisina modificada y la segunda sobre una lisina nativa.

[0021] Dado que la estructura secundaria cumple un gran rol en la determinación de si se transamida una lisina, y es poco probable que la estructura secundaria de la bisagra entre los mutantes Fab' cambie significativamente, fue inesperado que no se transamidaran el Lys222 nativo y los mutantes C226K, P227K, C229K, A231K, P232K, L234K y L235K. Se analizaron las secuencias primarias que rodean a las mutaciones de lisina. Se había demostrado previamente que un residuo C-terminal (+1) para un aceptor de acilo afecta la transamidación; específicamente un residuo +1 ácido o prolina, da como resultado poca o ninguna transamidación; véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/269.138, presentada el 18 de diciembre, 2015, y PCT/US2016/067165, presentado el 16 de diciembre, 2016, cuyos contenidos completos de cada uno se incorpora expresamente en la presente a modo de referencia. Los mutantes C226K, P227K, C229K y A231K tienen todos un +1 prolina y el P232K tiene un +1 glutamato. Además, Lys222 y L234K tienen un residuo -1 ácido. Es posible que cualquiera de los residuos ácidos que flanquean un aceptor de acilo inhiba la transamidación. Por ende, se efectuaron mutaciones de alanina para mutar ya sea el residuo ácido -1 o +1 o +1 prolina. En efecto, la mutación de los residuo ácidos y prolina dio como resultado una transamidación eficaz de las sustituciones de lisina (Tabla 8). La mutación D221A aumentó la transamidación de 5% a 66%. De manera similar, la mutación de los residuos ácidos -1 o +1 en los Fab' P232K, E233A

y E233A,L234K dio como resultado una mayor transamidación de entre 46% y 93% y entre 62% y 86%, respectivamente. La mutación de una +1 prolina presentaba resultados similares para los mutantes de lisina C226K (52% al 71%), P227K (57% al 81%), C229K (33% al 91%) y A231K (22% al 93%).

[0022] El efecto de la longitud de la bisagra sobre la transamidación de los mutantes T223K, H224K, T225K, P228K, P230K y E233K se analizó mediante supresión saldo el residuo +1 adyacente. La eliminación de los residuos C-terminal de la bisagra no tuvieron un efecto negativo sobre la transamidación del sitio aceptor de acilo modificado para los mutantes T223K, H224K y T225K, y una mayor transamidación de los mutantes P228K, P230K y E233K (Tabla 8).

Tabla 8: Las mutaciones de lisina en la bisagra en un Fab', pero no un mAb, eran aceptores de acilos.

		% de conjugación		
		+1 biotina	+2 biotinas	Total
M9-Fab	DKTHTAPPAPAPELL	4,7%		4,7%
D221A	AKTHTAPPAPAPELL	65,9%		65,9%
D221K	KKTHTAPPAPAPELL	89,6%		89,6%
T223K	DKKHTAPPAPAPELL	51,1%	34,2%	85,3%
T223K-H	DKKH	56,6%	25,9%	82,5%
H224K	DKTKTAPPAPAPELL	87,7%	2,6%	90,2%
H224K-T	DKTKT	83,6%	5,4%	89,0%
T225K	DKTHKAPPAPAPELL	69,6%	12,2%	81,8%
T225K-A	DKTHKA	62,6%	14,2%	76,8%
C226K	DKTHTKPPAPAPELL	52,2%		52,2%
C226K,P228A	DKTHTKAPAPAPELL	60,1%	11,2%	71,3%
P227K	DKTHTAKPAPAPELL	56,8%		56,8%
P227K,P228A	DKTHTAKAAPAPELL	62,6%	17,9%	80,5%
P228K	DKTHTAPKAPAPELL	16,5%		16,5%
P228K-A	DKTHTAPKA	65,8%	28,7%	94,4%
C229K	DKTHTAPPKPAPELL	32,5%		32,5%
C229K,P230A	DKTHTAPPKAAPELL	77,3%	13,3%	90,6%
P230K	DKTHTAPPAKAPPELL	63,9%	14,8%	78,7%
P230K-A	DKTHTAPPAKA	75,7%	17,1%	92,8%
A231K	DKTHTAPPAPKPELL	22,0%		22,0%
A231K,P232A	DKTHTAPPAPKAELL	79,3%	13,6%	92,9%
P232K	DKTHTAPPAPAKELL	40,6%	5,5%	46,2%
P232K,E233A	DKTHTAPPAPAKALL	85,0%	7,7%	92,6%

E233K	DKTHTAPPAPAPKLL	51,5%		51,5%
E233K-L	DKTHTAPPAPAPKL	82,4%	9,0%	91,4%
L234K	DKTHTAPPAPAPEKL	53,2%	8,5%	61,7%
E233A,L234K	DKTHTAPPAPAPAKL	75,4%	10,9%	86,3%
L235K	DKTHTAPPAPAPELK	7,8%		7,8%

Los Fab' mutantes de bisagra mutante purificados fueron seleccionados para la transamidación mediante incubación de mTGasa con Z-Gln-Gly-CAD-biotina durante la noche a 37 °C. Se analizaron las masas de HC mediante ESI-MS y se determinó el porcentaje de conjugación.

Ejemplo 10: Generación de moléculas de anticuerpo diméricas

[0023] Además de la transamidación mediada por mTGasa entre un donante de acilo de molécula pequeña y un aceptor de acilo de molécula grande, se analizó la transamidación de los mutante Fab con un mAb que contiene un donante de acilo. El mutante de mAb N297Q contiene dos sitios donantes de acilo en las posiciones 295 y 297. Jeger *et al.*, *Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase*, *Angew. Chem Int Ed Engl*, (2010) 49: 9995-9997. Los mutantes de Fab', D221K, H224K, T225K, P228K, P230K y E233K, se incubaron con N297Q y mTGasa durante la noche a 37 °C. Las muestras se redujeron y analizaron con SDS-PAGE. Los mAb y Fab' no conjugados darán bandas en 23 kDa (LC), 25 kDa (Fab-Vh-CH1), 38 kDa (mTGasa) y 49 kDa (HC). Una sola conjugación de mAb-Fab' resultará en una banda a 73 kDa y la conjugación de dos Fab' con un mAb dará como resultado una banda a 98 kDa. En efecto, todas las muestras contienen bandas a ambos ~75 y ~100 kDa (Figura 11).

Conclusión de los Ejemplos

[0024] Dado el número de lisinas nativas en los bucles y giros expuestos dentro de un anticuerpo, fue inesperado no encontrar ningún aceptor de acilo adecuado sobre ningún anticuerpo evaluado. Estos resultados contrastan claramente con el concepto previo en el campo, incluyendo aquellos informados por Mindt *et al.*, 2008, quienes supuestamente demostraron la conjugación de un

promedio de 0,3 moléculas de un colorante fluorescente con un residuo lisina natural sobre el anticuerpo chCE7. Presuntamente, Mindt también informó un nivel bajo (0,1 moléculas/anticuerpo) de transamidación de un sustrato aceptor de acilo para el mismo anticuerpo, chCE7. Sin embargo, numerosas publicaciones posteriores no pudieron repetir los hallazgos de Mindt (véase Strop *et al.*, 2013; Jeger *et al.*, 2010; y Siegmund *et al.*, 2015). Específicamente, Jeger indicó que “no se observó modificación de los chCE7 o RTX nativos con ninguno de los sustratos” (véase Jeger *et al.*, 2010). Por ello, los hallazgos divulgados en Mindt probablemente se debían ya sea a la fluorescencia basal del ensayo o específico del aceptor o donante de acilo ubicados en las regiones variables de chCE7.

[0025] Aunque no se encontraron aceptores de acilo sobre los anticuerpos monoclonales de tipo salvaje, las sustituciones de un solo aminoácido lisina sorprendentemente reveló varias posiciones por todo el un anticuerpo que se pueden modificar para que sean aceptores de acilo. Se identificó por lo menos un sitio en cada uno de los dominios de la región constante de las HC y LC (Figura 12). Más allá de su posición en los bucles o giros expuestos al solvente, no había una clara secuencia consenso que rodea los sitios aceptores de acilo. Los ejemplos de secuencias de los sitios que fueron transamidados mayores que un 70% fueron KSK₁₃₅SG, STK₁₃₆GG, SSK₁₉₃GT, TLK₂₅₂IS, QYK₂₉₇ST, LSK₄₄₅G*, QGK₂₀₁SS, GLK₂₀₂SP, PTK₂₁₃CS. Se encontraron secuencias similares rodeando a las lisinas que no fueron transamidadas, tal como en CH1 (SSK₁₃₃ST), CH3 (LTK₃₆₀NQ) y kappa (QLK₁₂₆SG, LSK₁₈₃AD).

[0026] Un residuo ácido o prolina que flanquea una lisina impidió la eficacia de transamidación, como lo demuestran las mutaciones en la bisagra de Fab. Además de mutar un residuo en una lisina, el sitio aceptor de acilo puede ser modificado mediante mutación de los residuos que flanquean una lisina existente. Sobre la base de la transamidación de Lys222 en el mutante D221A de Fab, sería

posible la mutación de otros residuos prolina o ácidos que flanquean la lisina nativa por todo el mAb. Por ejemplo, las lisinas PK₂₄₆P, PK₂₄₈D, TK₂₉₀P, GK₃₁₇E y DK₄₁₄S de IgG1, las lisinas SK₁₆₉D y EK₁₈₈H de kappa y las lisina EK₂₀₇T de lambda están flanqueadas por residuos ácidos y prolina, y la mutación en algo distinto de un residuo ácido o prolina puede crear un sitio aceptor de acilo en dicha lisina particular. Además, sería posible que algunos sitios faltaban en la mutagénesis por barrido de lisina debido a que la lisina mutante es adyacente a un residuo ácido o prolina, como fue el caso de varios mutantes de bisagra del Fab.

[0027] También se mostró que la estructura que rodea al residuo afecta la transamidación. Al eximir el núcleo y la región de bisagra inferior de cualquier estructura contribuida por CH2 y/o los enlaces disulfuro entre cadenas por medio de la generación de fragmentos Fab, las lisinas que no fueron transamidados en el contexto de un mAb fueron transamidadas en un Fab. En el contexto de un mAb de longitud completa con enlaces disulfuro entre cadenas en las cisteínas 226 y 229, P230K y E233K no fueron transamidados. Sin embargo, estos residuos fueron transamidados en el contexto de un fragmento Fab y ningún enlace disulfuro entre cadenas. Un enlace disulfuro que flanquea un sitio aceptor de acilo no impide por sí mismo la transamidación, ya que la posición +1 en el mutante E213K de lambda es un enlace disulfuro entre cadenas, y el mutante era transamidado. Por ende, ya sea un cambio de la estructura tridimensional de la región de bisagra mediante eliminación de los enlaces disulfuro intercatenarios y/o la eliminación de posibles restricciones estéricas del dominio CH2 cercano, permitió la transamidación de lisinas en estos sitios.

[0028] La mTGasa se ha investigado con anterioridad como un medio para transamidar glutaminas mediante modificación de los mAb con uno de dos métodos. Josten, *et al.*, *Use of microbial transglutaminase for the enzymatic biotinylation of antibodies*, *J Immunol. Methods*, (2000) 240: 47-54; Mindt, *et al.*, *Modification of*

different IgG1 antibodies via glutamine and lysine using bacterial and human tissue transglutaminase, *Bioconjug. Chem*, (2008) 19: 271-278; Jeger, et al., Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase, *Angew. Chem Int Ed Engl*, (2010) 49: 9995-9997; Strop, et al., Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates, *Chem Biol*, (2013) 20: 161-167. Si bien es eficaz en la conjugación de sustratos basados en amina en los mAb, ambos métodos tienen desventajas. El primer abordaje requiere la desglicosilación del mAb ya sea enzimáticamente o mediante mutagénesis. Mindt, et al., Modification of different IgG1 antibodies via glutamine and lysine using bacterial and human tissue transglutaminase, *Bioconjug. Chem*, (2008) 19: 271-278; Jeger, et al., Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase, *Angew. Chem Int Ed Engl*, (2010) 49: 9995-9997. Los mAb aglicosilados sufren un cambio de conformación que disminuye la estabilidad térmica, aumenta la susceptibilidad a proteasas y aumenta los índices de agregación. Mimura, et al., The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms, *Mol Immunol.*, (2000) 37: 697-706; Kwon, et al., Effect of glycosylation on the stability of alpha1-antitrypsin toward urea denaturation and thermal deactivation, *Biochim. Biophys. Acta*, (1997) 1335: 265-272; Wang, et al., pH dependent effect of glycosylation on protein stability, *Eur J Pharm Sci*, (2008) 33: 120-127; Yamaguchi, et al., Glycoform-dependent conformational alteration of the Fc region of human immunoglobulin G1 as revealed by NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, (2006) 1760: 693-700; Arnold, et al., The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins, *Annu Rev Immunol.*, (2007) 25: 21-50; Zheng, et al., The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability, *MAbs.*, (2011) 3: 568-576. La sustitución N297K dio como resultado un sitio de transamidación, y el uso de este

sitio también tiene la misma desventaja que la mutación N297Q.

[0029] El segundo abordaje comprende la modificación de una marca de glutamina de 4 aminoácidos, LLQG, por cualquiera de los extremos terminales o dentro de una región expuesta al solvente del mAb. Strop, *et al.*, *Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates*, *Chem Biol*, (2013) 20: 161-167. La adición de los 4 aminoácidos aumenta la probabilidad de una respuesta inmunogénica en un paciente que reduciría la eficacia del ADC. Por el contrario, las modificaciones que se describen en la presente utilizan sustituciones de aminoácidos simples o de un solo aminoácido, por ejemplo, lisina, inserciones como sitios de conjugación, reduciendo de esa manera la probabilidad de generar una respuesta inmunológica en los pacientes. Además, se pueden usar múltiples sitios por todos los dominios constantes de IgG, kappa y lambda si se encuentra que un sitio confiere una propiedad indeseable a la mAb, tal como una mayor agregación o inmunogenicidad.

[0030] En resumen, se pueden modificar los sitios aceptores de acilo en un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, ya sea mediante inserción de una lisina entre dos residuos nativos o mediante una sustitución de lisina en varias posiciones por toda la IgG1-4, kappa o lambda. El contexto óptimo para un sitio aceptor de acilo no solo es dependiente de la posición, sino que tampoco requiere un residuo ácido en la posición -1 o +1 o ninguna prolina en la posición +1. La tecnología de conjugación con transglutaminasas microbianas puede utilizar estos sitios modificados para conjugar una variedad de agentes funcionales que contienen al donante de acilo en la elaboración de ADC, anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas u otros complejos de mAb-proteína.

[0031] Los especialistas en el arte podrán apreciar que es posible efectuar numerosos cambios y modificaciones en las formas de realización preferidas de la invención y que dichos cambios y modificaciones se pueden realizar sin apartarse

del espíritu de la invención. Por ello, se pretende que las reivindicaciones adjuntas abarcan todas dichas variaciones equivalentes que caen dentro del verdadero espíritu y alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS INFORMAL

SEQ ID N°	Anticuerpo/Dominio	Secuencia
1	4F3F-VH	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYS FTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNG ASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLL SLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGS GTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPC
2	4F3F-VK	DIELTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSV SYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGS VPGRFSGSGSGNSYSLTISSEAEEDDATY YCQQWSKHPLTFGSGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
3	4HK0-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPN SGGTNYAQKFQGWVTMTRDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARGGLEPRSDVYYY YGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKHHHHHH
4	4HK0-VK	QSVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGS KSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGI PERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYY CQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
5	1FC1	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPQVKFNWYV DGVQVHNAKTKPREQQYNSTYRVVSVLT VLHQNWLDGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI

		SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
6	Anticuerpo 02HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	Anticuerpo 02LC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
8	Anticuerpo 03HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
9	Anticuerpo 03LC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	Anticuerpo 01HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD

		GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	Anticuerpo 01LC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
12	Anticuerpo 04HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	Anticuerpo 04LC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
14	Anticuerpo 05HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	Anticuerpo 05LC	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
16	Anticuerpo 06HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR

		EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
17	Anticuerpo 06LC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	gamma 1 humana	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
19	kappa humana	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
20	lambda humana	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNKYAASSYLSTPEQWWSHKSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
21	Anticuerpo 01HC- A118K	KSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	Anticuerpo 01HC- S119K	AKTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

			KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
23	Anticuerpo T120K	01HC-	ASKKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
24	Anticuerpo G122K	01HC-	ASTKKPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	Anticuerpo S131K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSKSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	Anticuerpo S132K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSKKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

			PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
27	Anticuerpo S134K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKKTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	Anticuerpo T135K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSKSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
29	Anticuerpo S136K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTKGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	Anticuerpo G137K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSKGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

			QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
31	Anticuerpo G138K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGKTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	Anticuerpo T139K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGKAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
33	Anticuerpo E152K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPPKPTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

34	Anticuerpo P153K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEKVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	Anticuerpo S160K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNKGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
36	Anticuerpo A162K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGKLTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
37	Anticuerpo L163K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGAKTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD

			GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
38	Anticuerpo T164K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALKSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
39	Anticuerpo S165K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
40	Anticuerpo G166K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
41	Anticuerpo V167K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGKHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR

			EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	Anticuerpo S176K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QKSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
43	Anticuerpo S177K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSKGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
44	Anticuerpo G178K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSKLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
45	Anticuerpo L179K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGKLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

			KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	Anticuerpo P189K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVKSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	Anticuerpo S190K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPKSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	Anticuerpo S191K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
49	Anticuerpo S192K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

			PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
50	Anticuerpo L193K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSKGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
51	Anticuerpo G194K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLKTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
52	Anticuerpo T195K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	Anticuerpo Q196K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

			QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	Anticuerpo T197K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
55	Anticuerpo P206K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
56	Anticuerpo S207K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

57	Anticuerpo E216K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVKPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
58	Anticuerpo P217K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEKKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
59	Anticuerpo S219K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKCKDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
60	Anticuerpo D221K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKCKDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD

			GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	Anticuerpo T223K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKKHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
62	Anticuerpo H224K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTKTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
63	Anticuerpo T225K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHKCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
64	Anticuerpo C226K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTKPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR

			EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
65	Anticuerpo P227K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCKPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
66	Anticuerpo P228K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPKCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
67	Anticuerpo C229K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPKPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
68	Anticuerpo P230K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCKA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

			KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
69	Anticuerpo A231K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPK PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
70	Anticuerpo P232K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA KELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
71	Anticuerpo E233K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PKLLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
72	Anticuerpo L234K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

			PEKLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
73	Anticuerpo L235K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELKGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
74	Anticuerpo G236K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLKGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
75	Anticuerpo G237K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGKPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
76	Anticuerpo P247K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

			QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
77	Anticuerpo M252K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLKISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
78	Anticuerpo I253K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMKSRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
79	Anticuerpo S254K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIKRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

80	Anticuerpo R255K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISKTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
81	Anticuerpo T256K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRKEP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
82	Anticuerpo D265K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVKVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
83	Anticuerpo S267K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD

			GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
84	Anticuerpo H268K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSKEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
85	Anticuerpo E269K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHKDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
86	Anticuerpo D270K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHKPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
87	Anticuerpo P271K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDKEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR

			EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
88	Anticuerpo E272K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPKVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
89	Anticuerpo D280K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVKGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
90	Anticuerpo G281K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDKVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
91	Anticuerpo V282K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGKEVHNA

			KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
92	Anticuerpo E283K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGKVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
93	Anticuerpo V284K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEKHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
94	Anticuerpo H285K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVKNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
95	Anticuerpo N286K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

			PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHKA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
96	Anticuerpo A287K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
97	Anticuerpo T289K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KKKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
98	Anticuerpo Q295K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
99	Anticuerpo Y296K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

			QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQKNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
100	Anticuerpo N297K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYKSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
101	Anticuerpo S298K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNKTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
102	Anticuerpo L309K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVKHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

103	Anticuerpo H310K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLKQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
104	Anticuerpo Q311K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHKDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
105	Anticuerpo D312K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQKWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
106	Anticuerpo L314K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWKN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD

			GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
107	Anticuerpo N315K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLK GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
108	Anticuerpo G316K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN KKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
109	Anticuerpo E318K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKKYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
110	Anticuerpo A327K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKKLPAPIEKTISKAKGQPR

			EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
111	Anticuerpo P329K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALKAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
112	Anticuerpo A330K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPKPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
113	Anticuerpo P331K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAKIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	Anticuerpo S337K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

			KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
115	Anticuerpo A339K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKKKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
116	Anticuerpo G341K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKKQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
117	Anticuerpo Q342K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGKPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
118	Anticuerpo P343K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

			PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQKR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
119	Anticuerpo R344K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPK EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	Anticuerpo E345K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR KPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
121	Anticuerpo R355K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSKDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
122	Anticuerpo D356K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

			QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRKELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
123	Anticuerpo L358K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDEKTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
124	Anticuerpo T359K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELKKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
125	Anticuerpo N361K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKKQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

126	Anticuerpo Q362K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNKVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
127	Anticuerpo S375K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PKDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
128	Anticuerpo D376K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSKIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
129	Anticuerpo E382K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWKSNGQPENNYKTTTPVLDSD

			GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
130	Anticuerpo N384K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESKGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
131	Anticuerpo G385K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNKQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
132	Anticuerpo Q386K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGKPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
133	Anticuerpo P387K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR

			EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQKENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
134	Anticuerpo N389K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPEKNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
135	Anticuerpo N390K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENKYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
136	Anticuerpo L398K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVKDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
137	Anticuerpo S400K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

			KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDKD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
138	Anticuerpo D401K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
139	Anticuerpo G402K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD KSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
140	Anticuerpo D413K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVKKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
141	Anticuerpo S415K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

			PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
142	Anticuerpo R416K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSKWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
143	Anticuerpo Q418K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWKQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
144	Anticuerpo Q419K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQKGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
145	Anticuerpo G420K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

			QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQKNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
146	Anticuerpo N421K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGKVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
147	Anticuerpo V422K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNKFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
148	Anticuerpo A431K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEKLHNHYTQKSLSLSPGK

149	Anticuerpo H433K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALKNHYTQKSLSLSPGK
150	Anticuerpo N434K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHKHYTQKSLSLSPGK
151	Anticuerpo H435K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNKYTQKSLSLSPGK
152	Anticuerpo Y436K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD

			GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHKTQKSLSLSPGK
153	Anticuerpo S442K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLKLSPGK
154	Anticuerpo L443K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSKSPGK
155	Anticuerpo S444K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLKPGK
156	Anticuerpo P445K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR

			EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPKK
157	Anticuerpo G446K	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPKK
158	Anticuerpo R108K	01LC-	KTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
159	Anticuerpo T109K	01LC-	RKVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
160	Anticuerpo V110K	01LC-	RTKAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
161	Anticuerpo A112K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
162	Anticuerpo D122K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
163	Anticuerpo E123K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
164	Anticuerpo S127K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
165	Anticuerpo G128K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV

			TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
166	Anticuerpo T129K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGKASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
167	Anticuerpo R142K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
168	Anticuerpo E143K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
169	Anticuerpo D151K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVKNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
170	Anticuerpo N152K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDKALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
171	Anticuerpo A153K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNKLQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
172	Anticuerpo L154K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNAKQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
173	Anticuerpo Q155K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALKSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
174	Anticuerpo S156K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQKGNQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
175	Anticuerpo G157K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSKNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
176	Anticuerpo E165K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TKQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC

177	Anticuerpo D167K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQKSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
178	Anticuerpo S168K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDKKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
179	Anticuerpo D170K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
180	Anticuerpo S182K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
181	Anticuerpo A184K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
182	Anticuerpo E187K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYKKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
183	Anticuerpo H189K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKKKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
184	Anticuerpo V191K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKKY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
185	Anticuerpo Q199K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHKGLSSPVTKSFNRGEC
186	Anticuerpo G200K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQKLSSPVTKSFNRGEC
187	Anticuerpo L201K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQKGSSPVTKSFNRGEC
188	Anticuerpo S202K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV

			TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLKSPVTKSFNRGEC
189	Anticuerpo S203K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSKPVTKSFNRGEC
190	Anticuerpo P204K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSKVTKSFNRGEC
191	Anticuerpo N210K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
192	Anticuerpo R211K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
193	Anticuerpo G212K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRKEC
194	Anticuerpo E213K	01LC-	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGKC
195	Anticuerpo G110K	05LC-	KQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
196	Anticuerpo Q111K	05LC-	GKPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
197	Anticuerpo P112K	05LC-	GQKKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
198	Anticuerpo A115K	05LC-	GQPKAKPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
199	Anticuerpo S125K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSKEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS

200	Anticuerpo E126K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSKELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
201	Anticuerpo L128K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
202	Anticuerpo Q129K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
203	Anticuerpo A130K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
204	Anticuerpo N131K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQAKKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
205	Anticuerpo G145K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
206	Anticuerpo A146K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGKVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
207	Anticuerpo V147K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAKTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
208	Anticuerpo S155K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADKSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
209	Anticuerpo S156K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSKPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
210	Anticuerpo P157K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSKVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
211	Anticuerpo A160K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKKGVETTTTP

			SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
212	Anticuerpo G161K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAKVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
213	Anticuerpo S171K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQKNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
214	Anticuerpo N172K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSKNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
215	Anticuerpo N173K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
216	Anticuerpo T184K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLKPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
217	Anticuerpo E186K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPKQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
218	Anticuerpo Q187K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEKWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
219	Anticuerpo S190K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKKHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
220	Anticuerpo H191K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
221	Anticuerpo E201K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHKGSTVEKTVAPTECS
222	Anticuerpo G202K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEKSTVEKTVAPTECS

223	Anticuerpo S203K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGKTVEKTVAPTECS
224	Anticuerpo P211K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAKTECS
225	Anticuerpo T212K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPKECS
226	Anticuerpo E213K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTKCS
227	Anticuerpo S215K	05LC-	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECK
228	Anticuerpo S191.K.S192	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
229	Anticuerpo S192.K.L193	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
230	Anticuerpo L193.K.G194	01HC-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

		QSSGLYSLSSVVTVPSSSLKGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
231	Anticuerpo 01-LC-K	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECK
232	Anticuerpo 01-LC-KL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECKL
233	Anticuerpo 01-LC-LK	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECKL
234	Anticuerpo 01-LC-LKL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECKL
235	Anticuerpo 01-LC-GGSGK	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSGK
236	Anticuerpo 01-LC-GGSGKL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSGKL
237	Anticuerpo 01HC-T135K-L448HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSKSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKL

238	Anticuerpo 01HC-S136K-N297K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTKGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYKSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
239	Anticuerpo 01HC-S136K-N297K-P445K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTKGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYKSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSKGK
240	IgG2 hu	AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSGF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
241	IgG3 hu	GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESSGQPENNYNTTPMLDSGSGF FLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSSVMHEAL HNRFTQKSLSLSPGK
242	IgG4 hu	GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSGF

		LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK
243	Anticuerpo 01IgG2HC	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
244	Anticuerpo 01IgG2HC-M252K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLKISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
245	Anticuerpo 01IgG2HC-N297K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFKSTFRVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
246	Anticuerpo 01IgG2HC-P445K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ

		VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
247	Anticuerpo 01IgG3HC	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYTCNV NHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPR CPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTFRVVSFLTTLHQQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
248	Anticuerpo 01IgG3HC-M252K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYTCNV NHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPR CPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLTKISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTFRVVSFLTTLHQQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
249	Anticuerpo 01IgG3HC-N297K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYTCNV NHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPR CPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YKSTFRVVSFLTTLHQQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK

250	Anticuerpo 01IgG3HC-P445K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV NHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPR CPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTFRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRT QKSLSLSKGK
251	Anticuerpo 01IgG4HC	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCSCAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVSLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK
252	Anticuerpo 01IgG4HC-M252K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCSCAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLKISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVSLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK
253	Anticuerpo 01IgG4HC-N297K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCSCAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFKSTYRVVSVSLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ

		VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLGK
254	Anticuerpo 01IgG4HC-L445K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEF LGGPSVFPLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLGK
255	Anticuerpo 01FabHC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPAP APELL
256	Anticuerpo 01FabHC-D221A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKVEPKSCAKTHTAPPAP APELL
257	Anticuerpo 01FabHC-D221K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKVEPKSCKTHTAPPAP APELL
258	Anticuerpo 01FabHC-T223K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKKHTAPPAP APELL
259	Anticuerpo 01FabHC-T223K-H	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKKH
260	Anticuerpo 01FabHC-H224K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTKTAPPAP APELL
261	Anticuerpo	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV

	01FabHC-H224K-T	KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTKT
262	Anticuerpo 01FabHC-T225K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHKAPPAP APELL
263	Anticuerpo 01FabHC-T225K-A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHKA
264	Anticuerpo 01FabHC-C226K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTKPPAP APELL
265	Anticuerpo 01FabHC- C226K,P228A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTKAPAP APELL
266	Anticuerpo 01FabHC-P227K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TAKPAP APELL
267	Anticuerpo 01FabHC- P227K,P228A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TAKAAP APELL
268	Anticuerpo 01FabHC-P228K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TAPKAP APELL
269	Anticuerpo 01FabHC-P228K-A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TAPKA
270	Anticuerpo 01FabHC-C229K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TAPPKP APELL

271	Anticuerpo 01FabHC- C229K,P230A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPKA APELL
272	Anticuerpo 01FabHC-P230K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPAK APELL
273	Anticuerpo 01FabHC-P230K-A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPAK A
274	Anticuerpo 01FabHC-A231K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPAP KPELL
275	Anticuerpo 01FabHC- A231K,P232A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPAP KAELL
276	Anticuerpo 01FabHC-P232K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPAP AKELL
277	Anticuerpo 01FabHC- P232K,E233A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPAP AKALL
278	Anticuerpo 01FabHC-E233K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPAP APKLL
279	Anticuerpo 01FabHC-E233K-L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPAP APKL
280	Anticuerpo	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV

	01FabHC-L234K	KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPAP APEKL
281	Anticuerpo 01FabHC- E233A,L234K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPAP APAKL
282	Anticuerpo 01FabHC-L235K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSKSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAPPAP APELK
283	Anticuerpo 01HC- N297Q	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN H KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
284	Secuencia señal	MGWSCIIILFLVATATGVHS