

GLICOSILACIÓN DE DOMINIOS VARIABLES ÚNICOS DE INMUNOGLOBULINA

Campo de la invención

La presente tecnología se refiere al campo de la glicosilación de dominios variables únicos de inmunoglobulina (DVUI). Más específicamente, la presente tecnología proporciona posiciones específicas dentro de la secuencia de aminoácidos de un DVUI para su uso como sitios aceptores de glicosilación. La presente tecnología también se refiere a DVUI modificados con glicanos específicos en los sitios aceptores de glicosilación especificados y a conjugados de los mismos. La presente tecnología también se refiere a polipéptidos que comprenden al menos un DVUI de la presente tecnología, al menos un DVUI con glicanos específicos o al menos un conjugado de los mismos. La invención se refiere además a una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que codifica dicho DVUI y/o polipéptido, a un método para producir dichos DVUI y/o polipéptidos, y a una composición que comprende dichos DVUI, conjugados y/o polipéptidos.

Antecedentes de la invención

En los últimos años, la terapia con anticuerpos ha ido ganando fuerza rápidamente en el mundo médico. La capacidad de dirigirse selectivamente solo a los tejidos afectados por la enfermedad, dejando el tejido sano intacto, es muy deseable para la calidad de vida de los pacientes.

Aunque la terapia con anticuerpos es específica de la diana, a menudo hay problemas al trabajar con moléculas biológicas complejas. Por ejemplo, problemas de estabilidad o solubilidad. En consecuencia, existe un impulso constante para mejorar las terapias con anticuerpos existentes.

La glicosilación es una modificación postraducciona de aplicación común en la terapia con anticuerpos, específicamente para anticuerpos monoclonales. La glicosilación es un proceso que puede requerirse para obtener la eficacia terapéutica deseada. Además, la glicosilación puede facilitar la conjugación de un anticuerpo con otro y/o con otros restos que pueden proporcionar funciones adicionales al anticuerpo.

Los dominios variables únicos de inmunoglobulina (DVUI) presentan un potencial terapéutico interesante en el campo de la terapia con anticuerpos debido a su pequeño tamaño. Además, la producción es mucho más simple, más rápida y más barata que la producción de anticuerpos monoclonales.

La glicosilación de los DVUI en sitios aceptores de glicosilación especificados se ha descrito en los documentos WO 2016/150845, WO 2018/206734 y WO 2021/116252.

Sin embargo, la glicosilación de los DVUI ha demostrado ser un desafío. Dependiendo de la célula hospedadora/organismo hospedador utilizados, la glicosilación no se producirá en absoluto o se producirá de maneras limitadas. Adicionalmente, la introducción de sitios aceptores de glicosilación frecuentemente dio lugar a interferencia en el plegamiento de las proteínas DVUI, con pérdida de afinidad y/o estabilidad y, por lo tanto, una pérdida de funcionalidad como consecuencia.

Sin embargo, dado que la glicosilación facilita la conjugación del DVUI con otros restos y puede tener un impacto en la eficacia terapéutica, sigue existiendo la necesidad de DVUI glicosilados eficaces y estables.

Sumario de la invención

La presente tecnología tiene como objetivo resolver problemas relacionados con la glicosilación de los DVUI. Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En otro aspecto, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En otro aspecto, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En un aspecto adicional, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI, en donde al menos uno de dichos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En un aspecto adicional más, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI, en donde al menos uno de dichos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 55, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

En otro aspecto, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI, en donde el DVUI N-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En otro aspecto más, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI, en donde el DVUI C-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 19, 26, 55, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

En un aspecto adicional, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende al menos tres DVUI, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En otro aspecto más, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI, en donde al menos uno de dichos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En otro aspecto, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI, en donde el DVUI N-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 15, 19, 26, 55, 73, 75, 76, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

5 En un aspecto adicional, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI, en donde el DVUI C-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26 y 105, según la numeración de Kabat.

10 En un aspecto adicional más, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI, en donde el DVUI que ni está en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

15 La presente tecnología también se refiere a dichos polipéptidos que se glicosilan en uno o más de estos sitios aceptores de glicosilación.

En otro aspecto, la presente tecnología se refiere a una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que codifica un polipéptido según la presente tecnología.

En un aspecto adicional, la presente tecnología se refiere a un método para producir un polipéptido según la presente tecnología, que comprende la etapa de:

20 - expresar la secuencia de nucleótidos o ácido nucleico según la presente tecnología en una célula hospedadora u organismo hospedador adecuado, en donde la célula hospedadora u organismo hospedador es capaz de glicosilar el polipéptido expresado.

25 En un aspecto adicional más, la presente tecnología se refiere a un método para la conjugación del polipéptido con un resto.

La presente tecnología también proporciona un conjugado que comprende el polipéptido glicosilado y un resto conjugado, en donde el resto se conjuga con el glicano en el polipéptido.

En otro aspecto, la presente tecnología se refiere a una composición que comprende el polipéptido, el ácido nucleico o el conjugado según la presente tecnología.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La **Figura 1** muestra el perfil de glicano como se mide mediante LC-QTOF de DVUI glicosilado T043800005.

La **Figura 2** muestra el perfil de glicano como se mide mediante LC-QTOF de DVUI glicosilado T043800002.

35 La **Figura 3** muestra la medición MALDI-TOF de conjugados de DVUI T043800005 con bis-manosa-6-fosfato como se describe en el Ejemplo 12.

La **Figura 4** muestra la medición MALDI-TOF de conjugados de DVUI T043800002 con bis-manosa-6-fosfato como se describe en el Ejemplo 12.

La **Figura 5** muestra la medición de citometría de flujo para evaluar la internalización de TNF en células Jurkat (**A**) o células K562 (**B**) después del tratamiento con complejo de TNF y DVUI anti-TNF o conjugado de bisM6P-DVUI anti-TNF a diversas concentraciones durante 1 y 4 h.

La **Figura 6** muestra el múltiplo de aumento en la intensidad media de fluorescencia (IMF) en células Jurkat (**A**) o células K562 (**B**) que indica la internalización de TNF mediante el conjugado bisM6P-DVUI anti-TNF sobre el DVUI anti-TNF solo.

La **Figura 7** muestra la inmunotransferencia tipo Western de TNF- α después del tratamiento con DVUI anti-TNF o bisM6P-DVUI anti-TNF en diversos puntos temporales en (**A**) lisados celulares, después de la internalización en células K562 o células Jurkat a 37 °C durante 2 h, seguido de un tratamiento con o sin bafilomicina durante 4 y 24 h, y (**B**) en sobrenadante del mismo cultivo de células K562.

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

A menos que se indique o defina lo contrario, todos los términos utilizados tienen su significado habitual en la técnica, que resultará claro para el experto. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales estándar, como Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2.^a Ed.) vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), F. Ausubel *et al.* (Current protocols in molecular biology, Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York, 1987), Lewin (Genes II, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1985), Old *et al.* (Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering (2.^a edición) University of California Press, Berkeley, CA, 1981); Roitt *et al.* (Immunology (6^a Ed.) Mosby/Elsevier, Edimburgo, 2001), Roitt *et al.* (Roitt's Essential Immunology (10^a Ed.) Blackwell Publishing, Reino Unido, 2001), y Janeway *et al.* (Immunobiology (6.^a Ed.) Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York, 2005), así como a los antecedentes generales citados en el presente documento.

A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera en sí misma conocida, como quedará claro para el experto. Se hace referencia de nuevo, por ejemplo, a los manuales estándar y a los antecedentes generales de la técnica mencionados en el presente documento y a las referencias adicionales citadas en los mismos; así como, por ejemplo, a las siguientes revisiones: Presta (Adv. Drug Deliv. Rev. 58 (5-6): 640-56, 2006), Levin y Weiss (Mol. Biosyst. 2(1): 49-57, 2006), Irving *et al.* (J. Immunol. Methods 248(1-2): 31-45, 2001), Schmitz *et al.* (Placenta 21 Supl. A: S106-12, 2000), Gonzales *et al.* (Tumour Biol. 26(1): 31-43, 2005), que describen técnicas para modificar por ingeniería genética proteínas, tales como maduración de la afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de proteínas tales como inmunoglobulinas.

El término "secuencia", tal como se utiliza en el presente documento (por ejemplo, en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable", "secuencia VHH" o "secuencia de proteína"), debe entenderse en general que incluye tanto la secuencia de aminoácidos pertinente como los ácidos nucleicos o las secuencias de nucleótidos que codifican la misma, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

Se considera que un ácido nucleico o un aminoácido está "(en) (forma) (esencialmente) aislado", por ejemplo, en comparación con el medio de reacción o el medio de cultivo del que se ha obtenido, cuando se ha separado de al menos otro componente con el que suele estar asociado en dicha fuente o medio, como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o al menos un contaminante, impureza o componente menor. En particular, un ácido nucleico o aminoácido se considera "(esencialmente) aislado" cuando se ha purificado al menos 2 veces, en particular al menos 10 veces, más en particular al menos 100 veces, y hasta 1000 veces o más. Un ácido nucleico o aminoácido que está "en forma (esencialmente) aislada" es preferiblemente esencialmente homogéneo, según se determine utilizando una técnica adecuada, como una técnica cromatográfica adecuada, como la electroforesis en gel de poliacrilamida.

Cuando se dice que una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos "comprende" otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, o que "consiste esencialmente en" otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, puede significar que esta última secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos se ha incorporado a la primera secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos mencionada, respectivamente, pero más habitualmente esto significa que la primera secuencia de nucleótidos o de aminoácidos mencionada comprende dentro de su secuencia un tramo de nucleótidos o de residuos de aminoácidos, respectivamente, que tiene la misma secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, respectivamente, que esta última secuencia, independientemente de cómo se haya generado u obtenido realmente la primera secuencia mencionada (que puede ser, por ejemplo, mediante cualquier método adecuado descrito en el presente documento). A modo de ejemplo no limitativo, cuando se dice que un polipéptido comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, esto puede significar que dicha secuencia de dominio variable único de inmunoglobulina se ha incorporado a la secuencia del polipéptido, pero más habitualmente esto significa que el polipéptido contiene dentro de su secuencia la secuencia de los dominios variables únicos de inmunoglobulina independientemente de cómo se haya generado u obtenido dicho polipéptido. Asimismo, cuando se dice que un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos comprende otra secuencia de nucleótidos, la primera secuencia de ácido nucleico o secuencia de nucleótidos mencionada es preferiblemente tal que, cuando se expresa en un producto de expresión (por ejemplo, un polipéptido), la secuencia de aminoácidos codificada por la última secuencia de nucleótidos forma parte de dicho producto de expresión (en otras palabras, que la última secuencia de nucleótidos está en el mismo marco de lectura que la primera secuencia de ácido nucleico o secuencia de nucleótidos mayor mencionada).

Por "consiste (esencialmente) en" se entiende que la secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos posterior, o bien es exactamente igual que el polipéptido (por ejemplo, la región CDR; el DVUI) o bien corresponde al polipéptido (por ejemplo, la región CDR; el DVUI) que tiene un número limitado de restos de aminoácidos, tales como 1 a 20 restos de aminoácidos, por ejemplo 1 a 10 restos de aminoácidos y preferiblemente 1 a 6 restos de aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 restos de aminoácidos, añadidos en el extremo aminoterminal, en el extremo carboxiterminal, o tanto en el extremo aminoterminal como en el extremo carboxiterminal del dominio variable único de inmunoglobulina.

Los residuos de aminoácidos se indicarán según el código estándar de aminoácidos de tres letras o de una letra. Véase la Tabla A-2 en la página 48 del documento WO 08/020079.

2. Polipéptidos y DVUI con sitios aceptores de glicosilación

La glicosilación de DVUI ha planteado un desafío. Los inventores han descubierto ahora sorprendentemente que los sitios aceptores de glicosilación pueden introducirse en posiciones previamente desconocidas, y que estos sitios aceptores de glicosilación proporcionan a los DVUI buenas propiedades de glicosilación, mientras que la glicosilación no interfiere con la unión y plegamiento del DVUI, que a su vez proporciona buenas propiedades de conjugación, por ejemplo, en la producción de conjugados de DVUI.

La glicosilación es la reacción en la que un hidrato de carbono (o 'glicano'), es decir, un donante de glicosilo, se une a un hidroxilo u otro grupo funcional de otra molécula (un aceptor de glicosilo) para formar un glicoconjugado. En biología, la glicosilación generalmente se refiere a una reacción catalizada por enzimas. La glicosilación es una forma de modificación cotraduccional y postraduccional. La mayoría de las proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso experimenta glicosilación. La glicosilación también está presente en el citoplasma y el núcleo como la modificación de O-GlcNAc. Se producen diferentes clases de glicanos: Glicanos ligados a N unidos a un nitrógeno de cadenas laterales de asparagina o arginina; glicanos ligados a O unidos al oxígeno de hidroxilo de serina, treonina, tirosina, hidroxilisina o hidroxiprolina, o a oxígenos en lípidos tales como ceramida; fosfoglicanos ligados a través del fosfato de una fosfoserina; y glicanos ligados a C, una forma rara de glicosilación donde un azúcar se añade a un carbono en una cadena lateral de triptófano.

Un "glicano", como se utiliza en el presente documento, generalmente se refiere a monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos ligados de manera glicosídica. Por lo tanto, las porciones de hidrato de carbono de un glicoconjugado, tales como una glicoproteína, un glicolípido o un proteoglicano, se denominan en el presente documento "glicano". Los glicanos pueden ser homo- o heteropolímeros de residuos de monosacáridos y pueden ser lineales o ramificados. Los glicanos ligados a N pueden estar compuestos por galactosa, ácido neuramínico, N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa, manosa y otros monosacáridos, como también se ejemplifica más adelante en el presente documento. En eucariotas, los glicanos ligados a O se ensamblan un azúcar a la vez en un residuo de serina o treonina de una cadena peptídica en el aparato Golgi. A diferencia de los glicanos ligados a N, no hay secuencias consenso conocidas, pero la posición de un residuo de prolina en -1 o +3 con respecto a la serina o treonina es favorable para la glicosilación ligada a O.

El término "dominio variable individual de inmunoglobulina" (DVUI), utilizado indistintamente con "dominio variable individual", define las moléculas de inmunoglobulina en las que el sitio de unión a antígeno está presente en, y formado por, un dominio individual de inmunoglobulina. Esto diferencia a los dominios variables únicos de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas "convencionales" (p. ej., anticuerpos monoclonales) u sus fragmentos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, di-scFv), en donde dos dominios de inmunoglobulina, concretamente dos dominios variables, interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. Normalmente, en inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada (VH)

y un dominio variable de cadena ligera (VL) interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) tanto de VH como de VL contribuirán al sitio de unión al antígeno, es decir, un total de 6 CDR participarán en la formación del sitio de unión al antígeno.

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

Por el contrario, los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden unirse
15 específicamente a un epítipo del antígeno sin emparejarse con un dominio variable de inmunoglobulina adicional. El sitio de unión de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por un dominio VH único, un dominio VHH único o un dominio VL único.

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

25 Un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) puede ser, por ejemplo, un DVUI de cadena pesada, como un VHH, incluido un VHH humanizado, un VH, incluido un VH camelizado y un VH humano. En una modalidad, es un VHH, un VH camelizado o un VHH humanizado. Los DVUI de cadena pesada pueden derivarse de un anticuerpo tetracatenario convencional o de un anticuerpo de cadena pesada.

Por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un anticuerpo de dominio
30 único (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para su uso como anticuerpo de dominio único), un "dAb" o dAb (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para su uso como dAb) o un NANOBODY® DVUI (como se define en el presente documento e incluyendo pero no limitándose a un VHH); otros dominios variables únicos, o cualquier fragmento adecuado de cualquiera de ellos. [Nota: NANOBODY® y NANBODIES® son marcas registradas de Ablynx N.V.]

35 En particular, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un DVUI NANOBODY® (como un VHH, incluido un VHH humanizado o un VH camelizado) o un fragmento adecuado del mismo.

Los "dominios VHH", también conocidos como VHH o fragmentos de anticuerpos VHH, se han descrito originalmente como el dominio variable de inmunoglobulina de unión a antígeno de los "anticuerpos

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

La generación de secuencias de inmunoglobulinas, como los VHH, se ha descrito ampliamente en diversas publicaciones, entre las que destacan el documento WO 94/04678, Hamers-Casterman et al. 1993 y Muyldermans et al. 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001). En estos métodos, se inmuniza a camélidos con el antígeno diana para inducir una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno diana. El repertorio de VHH obtenido de dicha inmunización se criba además en busca de VHH que se unan al antígeno diana. En estos casos, la generación de anticuerpos requiere un antígeno purificado para la inmunización y/o el cribado. Los antígenos pueden purificarse de fuentes naturales o en el transcurso de una producción recombinante. La inmunización y/o el cribado de secuencias de inmunoglobulina pueden realizarse usando fragmentos peptídicos de dichos antígenos.

En la presente tecnología pueden utilizarse secuencias de inmunoglobulina de distinto origen, que comprenden secuencias de inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, burro, ser humano y camélido. También pueden utilizarse secuencias totalmente humanas, humanizadas o quiméricas. Por ejemplo, en el presente documento se pueden usar secuencias de inmunoglobulina de camélido y secuencias de inmunoglobulina de camélido humanizadas, o anticuerpos de dominio camelizados, por ejemplo, dAb camelizados como se describe por Ward *et al.* (véanse, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Riechmann, *Febs Lett.*, 339:285-290, 1994 y Prot. Eng., 9:531-537, 1996) pueden utilizarse en el presente documento. Los DVUI pueden fusionarse formando una construcción multivalente y/o multiespecífica (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios VHH y su preparación, también se hace referencia a Conrath *et al.* 2001 (J. Biol. Chem., Vol. 276, 10). 7346-7350), así como, por ejemplo, los documentos WO 96/34103 y WO 99/23221).

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el DVUI comprendido en la presente tecnología no está limitado en cuanto al origen de la secuencia del DVUI (o en cuanto a la secuencia de nucleótidos utilizada para expresarlo), ni en cuanto a la forma en que la secuencia del DVUI o la secuencia de nucleótidos es (o ha sido) generada u obtenida. De este modo, las secuencias de DVUI pueden ser secuencias naturales (de cualquier especie adecuada) o secuencias sintéticas o semisintéticas. En un aspecto específico pero no limitativo, la secuencia DVUI es una secuencia de origen natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia sintética o semisintética, incluidas pero sin limitación, secuencias de inmunoglobulina "humanizadas" (como se definen en el presente documento) (como secuencias de inmunoglobulina de camélido, ratón o conejo parcial o totalmente humanizadas, y en particular secuencias VHH parcial o totalmente humanizadas), secuencias de inmunoglobulina "camelizadas" (como se definen en el presente

documento) (y en particular secuencias VH camelizadas), así como DVUI que se han obtenido mediante técnicas tales como la maduración de la afinidad (por ejemplo, partiendo de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias o naturales), injerto de CDR, enchapado, combinación de fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamblaje por PCR utilizando cebadores solapados, y técnicas similares para la ingeniería de secuencias de inmunoglobulina bien conocidas por el experto o cualquier combinación adecuada de cualquiera de las anteriores.

Asimismo, las secuencias de nucleótidos pueden ser secuencias de nucleótidos de origen natural o secuencias sintéticas o semisintéticas, y pueden ser, por ejemplo, secuencias aisladas por PCR de un molde de origen natural adecuado (por ejemplo, ADN o ARN aislado de una célula), secuencias de nucleótidos que se han aislado de una colección (y, en particular, una colección de expresión), secuencias de nucleótidos que se han preparado introduciendo mutaciones en una secuencia de nucleótidos de origen natural (usando cualquier técnica adecuada conocida *per se*, tal como PCR con emparejamientos incorrectos), secuencias de nucleótidos que se han preparado mediante PCR usando cebadores solapantes, o secuencias de nucleótidos que se han preparado usando técnicas de síntesis de ADN conocidas *per se*.

Un "VHH humanizado" comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio VHH natural, pero que se ha "humanizado", es decir, sustituyendo uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia VHH natural (y en particular en las secuencias marco) por uno o más de los restos de aminoácidos que se encuentran en la posición o posiciones correspondientes en un dominio VH de un anticuerpo convencional de 4 cadenas de un ser humano. Esto puede realizarse de una manera conocida *per se*, que será obvia para el experto, por ejemplo, basándose en la técnica anterior (por ejemplo, documento WO 2008/020079). Una vez más, cabe señalar que dichos VHH humanizados pueden obtenerse de cualquier manera adecuada por sí misma conocida y, por lo tanto, no se limitan estrictamente a los polipéptidos que se han obtenido utilizando un polipéptido que comprende un dominio VHH natural como material de partida.

Un "VH camelizado" comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural, pero que se ha "camelizado", es decir, sustituyendo uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural de un anticuerpo convencional de 4 cadenas por uno o más de los restos de aminoácidos que se encuentran en la posición o posiciones correspondientes en un dominio VHH de un anticuerpo (camélido) de cadena pesada. Esto puede llevarse a cabo de una manera por sí misma conocida, que será evidente para el experto, por ejemplo sobre la base de la descripción en la técnica anterior (p. ej., Davies y Riechman (1994 y 1996), citado anteriormente). Dichas sustituciones "camelizantes" se insertan en posiciones de aminoácidos que forman y/o están presentes en la interfaz VH-VL, y/o en los denominados residuos distintivos de camélidos, tal como se definen en el presente documento (véanse, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994 y 1996), anteriormente citado). En una modalidad, la secuencia VH que se utiliza como material de partida o punto de partida para generar o diseñar el VH camelizado es una secuencia VH de un mamífero, como la secuencia VH de un ser humano, como una secuencia VH3. Sin embargo, cabe

señalar que dichos VH camelizados pueden obtenerse de cualquier manera adecuada por sí misma conocida y, por tanto, no se limitan estrictamente a los polipéptidos que se han obtenido utilizando como material de partida un polipéptido que comprende un dominio VH natural.

Se puede considerar que la estructura de una secuencia de dominio variable individual de inmunoglobulina comprende cuatro regiones estructurales ("FR"), a las que se hace referencia en la técnica y en este documento como "región estructural 1" ("FR1"), "región estructural 2" ("FR2"), "región estructural 3" ("FR3") y "región estructural 4" ("FR4"), respectivamente; cuyas regiones estructurales están interrumpidas por tres regiones determinantes de la complementariedad ("CDR"), a las que se hace referencia en la técnica y en este documento como "región determinante de la complementariedad 1" ("CDR1"), "región determinante de la complementariedad 2" ("CDR2") y "región determinante de la complementariedad 3" ("CDR3"), respectivamente.

Como se describe con más detalle en el párrafo q) de las páginas 58 y 59 del documento WO 08/020079, los restos de aminoácidos de un DVUI pueden numerarse de acuerdo con la numeración general para dominios VH dada por Kabat *et al.* ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, publicación n.º 91), tal como se aplica a los dominios V_{HH} de camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans, 2000 (J. Immunol. Methods 240 (1-2): 185-195; véase, por ejemplo, la figura 2 de esta publicación). En la presente solicitud, salvo que se especifique lo contrario, la secuencia de los DVUI se determina según la numeración de Kabat.

Cabe señalar que, como es bien sabido en la técnica para los dominios VH y para los dominios VHH, el número total de restos de aminoácidos en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de restos de aminoácidos indicado por la numeración de Kabat. Es decir, una o más posiciones de acuerdo con la numeración de Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más restos de aminoácidos que el número permitido por la numeración de Kabat. Esto significa que, en general, la numeración de acuerdo con Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los residuos de aminoácidos en la secuencia real. El número total de restos de aminoácidos en un dominio VH y un dominio VHH estará normalmente en el intervalo de 110 a 120, a menudo entre 112 y 115. Sin embargo, cabe señalar que secuencias más cortas y más largas también pueden ser adecuadas para los propósitos descritos en este documento.

La determinación de las regiones CDR también puede realizarse de acuerdo con diferentes métodos. En la determinación de las CDR de acuerdo con Kabat, la FR1 de un ISVD comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 1-30, la CDR1 de un ISVD comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 31-35, la FR2 de un ISVD comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, la CDR2 de un ISVD comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 50-65, la FR3 de un ISVD comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 66-94, la CDR3 de un ISVD comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 95-102 y la FR4 de un ISVD comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

Las secuencias estructurales son (una combinación adecuada de) secuencias estructurales de inmunoglobulina o secuencias estructurales que proceden de secuencias estructurales de inmunoglobulina

(por ejemplo, por humanización o camelización). Por ejemplo, las secuencias marco pueden ser secuencias marco derivadas de un dominio variable de cadena ligera (p. ej., una secuencia VL) y/o de un dominio variable de cadena pesada (p. ej., una secuencia VH o una secuencia VHH). En un aspecto particular, las secuencias marco son secuencias marco que proceden de una secuencia VHH (en donde dichas secuencias marco pueden opcionalmente haber sido parcial o totalmente humanizadas) o son secuencias VH convencionales que han sido camelizadas (como se define en el presente documento).

En particular, las secuencias marco presentes en las secuencias DVUI utilizadas en los métodos descritos en el presente documento pueden contener uno o más de los residuos distintivos (tal como se definen en el presente documento a continuación), de tal manera que la secuencia DVUI es un DVUI NANOBODY®, como, por ejemplo, una VHH, incluyendo una VHH humanizada, o una VH camelizada. Ejemplos no limitantes de (combinaciones adecuadas de) dichas secuencias estructurales resultarán evidentes a partir de la divulgación adicional de este documento.

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

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que uno o más de los residuos distintivos son como se definen con más detalle en este documento.

En particular, un DVUI NANOBODY® puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

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

en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones estructurales 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que las secuencias estructurales son como se definen con más detalle en este documento.

Más en particular, un DVUI NANOBODY® puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

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

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

Tabla 1: Residuos distintivos en los DVUI NANOBODY®

Posición	VH3 humano	Residuos distintivos
----------	------------	----------------------

5	11	L, V; predominantemente L	L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; preferentemente L
	37	V, I, F; normalmente V	F ⁽¹⁾ , Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, preferiblemente F ⁽¹⁾ o Y
	44 ⁽⁸⁾	G	E ⁽³⁾ , Q ⁽³⁾ , G ⁽²⁾ , D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; preferiblemente G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ o Q ⁽³⁾ ; mucho más preferiblemente G ⁽²⁾ o Q ⁽³⁾ .
	45 ⁽⁸⁾	L	L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; preferiblemente L ⁽²⁾ o R ⁽³⁾
10	47 ⁽⁸⁾	W, Y	F ⁽¹⁾ , L ⁽¹⁾ o W ⁽²⁾ G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; preferiblemente W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ o F ⁽¹⁾
	83	R o K; normalmente R	R, K ⁽⁵⁾ , T, E ⁽⁵⁾ , Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; preferiblemente K o R; muy preferiblemente K
15	84	A, T, D; predominantemente A	P ⁽⁵⁾ , S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; preferiblemente P
	103	W	W ⁽⁴⁾ , R ⁽⁶⁾ , G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P ⁽⁶⁾ , E, C; preferiblemente W
	104	G	G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; preferentemente G
20	108	L, M o T; predominantemente L	Q, L ⁽⁷⁾ , R, P, E, K, S, T, M, A, H; preferiblemente Q o L ⁽⁷⁾
<u>Notas:</u> (1) En particular, pero no exclusivamente, en combinación con KERE o KQRE en las posiciones 43-46. (2) Normalmente como GLEW en las posiciones 44-47. (3) Normalmente como KERE o KQRE en las posiciones 43-46, por ejemplo, como KEREL, KEREF, KQREL, KQREF, KEREG, KQREW o KQREG en las posiciones 43-47. Como alternativa, también son posibles secuencias tales como TERE (por ejemplo, TEREL), TQRE (por ejemplo, TQREL), KECE (por ejemplo, KECCEL o KECER), KQCE (por ejemplo, KQCEL), RERE (por ejemplo, REREG), RQRE (por ejemplo, RQREL, RQREF o RQREW), QERE (por ejemplo, QEREG), QQRE, (por ejemplo, QQREW, QQREL o QQREF), KGRE (por ejemplo, KGREG), KDRE (por ejemplo, KDREV). Otras secuencias posibles pero menos preferidas son, por ejemplo, DECKL y NVCEL. (4) Con GLEW en las posiciones 44-47 y KERE o KQRE en las posiciones 43-46. (5) A menudo como KP o EP en las posiciones 83-84 de los dominios VHH de origen natural. (6) En particular, pero no exclusivamente, en combinación con GLEW en las posiciones 44-47. (7) Con la salvedad de que cuando las posiciones 44-47 son GLEW, la posición 108 es siempre Q en las secuencias V_{HH} (no humanizadas) que también contienen un W en 103.			

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

En un primer aspecto, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 76, 102, 105, 68, 73, 75, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

La expresión "sitio aceptor de glicosilación" se refiere a una posición dentro del DVUI, que puede estar N- u O-glicosilada. Los glicanos ligados a N normalmente se unen a la asparagina (Asn), mientras que los glicanos ligados a O se unen comúnmente al oxígeno de hidroxilo de las cadenas laterales de serina, treonina, tirosina, hidroxilisina o hidroxiprolina. En una realización, el sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación. En una realización, el sitio aceptor de glicosilación para la N-glicosilación es asparagina (Asn). En una realización, el sitio aceptor de glicosilación para la O-glicosilación es serina, treonina, tirosina, hidroxilisina o hidroxiprolina.

Sorprendentemente, los inventores encontraron que además de sitios aceptores de glicosilación conocidos, se pueden crear nuevos sitios aceptores de glicosilación en la secuencia de aminoácidos de DVUI en una posición previamente desconocida para ser adecuada para la glicosilación.

Para una transferencia eficiente del glicano, en una realización, la asparagina se ubica en una secuencia consenso específica en la estructura primaria del polipéptido (NXS, NXT o NXC). Como tal, un sitio aceptor de glicosilación para la glicosilación ligada a N normalmente estará contenido en un motivo NXT o motivo NXS (en el que X puede ser cualquier residuo de aminoácido) cuyo motivo está glicosilado en el residuo de asparagina (N). Por lo tanto, en la presente tecnología, cuando se afirma que una posición puede ser glicosilada, y se pretende que esta posición esté N-glicosilada, entonces la secuencia primaria del DVUI según la presente tecnología contendrá generalmente un motivo NXT o NXS (introducido adecuadamente mutando y/o sustituyendo la posición o posiciones de aminoácidos relevantes) de tal manera que el residuo de asparagina de dicho motivo esté presente en la posición a glicosilar, es decir, en el sitio de aceptor de glicosilación.

Por lo tanto, en una realización adicional, el sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En otra realización, el sitio aceptor de glicosilación está presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 19, 26 y 105, según la numeración de Kabat.

Se descubrió que los DVUI con una de estas tres posicionesceptoras de glicosilación 19, 26 y 105 tenían grados significativamente altos de glicosilación en cualquier formato, monovalente o

multivalente, independientemente de la posición de DVUI dentro de una construcción cuando se usaron en una construcción de este tipo.

En una realización, el polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI. En esta realización, puede ser que dicho sitio aceptor de glicosilación esté presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En una realización adicional, el polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI. En esta realización, puede ser que dicho sitio aceptor de glicosilación esté presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

El proceso de diseñar/seleccionar y/o preparar un polipéptido, partiendo de un dominio variable único de inmunoglobulina como un VHH, VHH humanizado, VH camelizado, anticuerpo de dominio o dAb, también se denomina en el presente documento "formatear" dicho dominio variable único de inmunoglobulina; y un dominio variable único de inmunoglobulina que forma parte de un polipéptido se dice que está "formateado" o que está "en el formato de" dicho polipéptido. Algunos ejemplos de formas en las que puede formatearse un dominio variable único de inmunoglobulina y algunos ejemplos de dichos formatos serán evidentes para el experto basándose en la presente divulgación; y dicho dominio variable único de inmunoglobulina formateado constituye otro aspecto de la presente tecnología.

Por ejemplo, y sin limitación, uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden utilizarse como "unidad de unión", "dominio de unión" o "bloque de construcción" (estos términos se utilizan indistintamente) para la preparación de un polipéptido, que puede contener opcionalmente uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina adicionales que pueden servir como unidad de unión.

La presente tecnología también proporciona un polipéptido o construcción que comprende o consiste esencialmente en uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina. Los polipéptidos monovalentes comprenden o consisten esencialmente en una sola unidad de unión (tal como, p. ej., los dominios variables únicos de inmunoglobulina). Los polipéptidos que comprenden dos o más unidades de unión (tal como, p. ej., dominios variables únicos de inmunoglobulina) también se denominarán en el presente documento polipéptidos "multivalentes", y las unidades de unión/dominios variables únicos de inmunoglobulina presentes en dichos polipéptidos también se denominarán en el presente documento como en "formato multivalente". Por ejemplo, un polipéptido "bivalente" puede comprender dos dominios variables únicos de inmunoglobulina, opcionalmente unidos mediante una secuencia de enlazador, mientras que un polipéptido "trivalente" puede comprender tres dominios variables únicos de inmunoglobulina, opcionalmente unidos mediante dos secuencias de enlazador; mientras que un polipéptido "tetraivalente" puede comprender cuatro dominios variables únicos de inmunoglobulina, opcionalmente unidos mediante tres secuencias de enlazador; mientras que un polipéptido "pentavalente" puede comprender cinco dominios variables únicos de inmunoglobulina, opcionalmente unidos mediante cuatro secuencias de enlazador; mientras que un polipéptido "hexavalente" puede comprender seis

dominios variables únicos de inmunoglobulina, opcionalmente unidos mediante cinco secuencias de enlazador, etc.

En otro aspecto, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En una realización, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En otra realización, la presente tecnología se refiere a un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En una realización adicional, la presente tecnología se refiere a un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

Los inventores encontraron sorprendentemente que las posiciones 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 102, 105, 108 y 110 son sitios aceptores de glicosilación en un DVUI que pueden glicosilarse para tener DVUI funcionales y suficientemente glicosilados, por ejemplo, para su uso como polipéptido monovalente y/o en conjugación con restos adicionales.

En un aspecto de la presente tecnología, dicho polipéptido según la presente tecnología comprende al menos dos DVUI. En esta realización puede ser que al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprenda un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En una realización, al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 55, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

Los inventores encontraron sorprendentemente que los sitios aceptores de glicosilación presentes en las posiciones 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110 podrían proporcionar un buen grado de glicosilación en un polipéptido multivalente, así como, por ejemplo, en un polipéptido que comprende al menos dos DVUI. De manera interesante, se encontró otra posición para su uso como sitio aceptor de glicosilación, a saber, la posición 3, que proporcionó un grado insuficiente de glicosilación en un formato monovalente, pero grados muy altos de glicosilación en un polipéptido multivalente. En particular, las posiciones 3, 19, 26, 55, 105 y 108 dieron altos grados de glicosilación independientemente de la

posición del DVUI dentro del polipéptido multivalente, tal como, por ejemplo, un polipéptido que comprende al menos dos DVUI.

En una realización adicional, dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI. En otra realización, al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En otra realización, dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI. En otra realización, al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 55, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI, en donde al menos uno de dichos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En una realización, al menos uno de dichos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 55, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

Los inventores descubrieron sorprendentemente que, para el uso de algunas posiciones como sitio aceptor de glicosilación, la ubicación del DVUI en el polipéptido tuvo un efecto sobre el grado de glicosilación obtenido. Específicamente, en algunas realizaciones, el grado de glicosilación dependió de si el DVUI con el sitio aceptor de glicosilación era el DVUI C-terminal o el DVUI N-terminal. Para el uso de las posiciones 3, 19, 26, 55, 105 y 108 como sitio aceptor de glicosilación, la ubicación del DVUI con el sitio aceptor de glicosilación en el polipéptido no tuvo ninguna influencia sobre el grado de glicosilación obtenido. Sin embargo, para el uso de las posiciones 53, 68, 75 y 110 como sitio aceptor de glicosilación, los inventores descubrieron sorprendentemente que se obtuvo una glicosilación deficiente cuando el DVUI que comprende el sitio aceptor de glicosilación era el DVUI C-terminal. Adicionalmente, para la posición 1 se obtuvo una glicosilación deficiente cuando el DVUI que comprende el sitio de glicosilación era el DVUI N-terminal, mientras que se obtuvo una buena glicosilación cuando el DVUI que comprende el sitio de glicosilación era el DVUI C-terminal. Se descubrió que la posición 15 tenía grados decentes, pero no altos, de glicosilación en el formato bivalente independientemente de la ubicación del DVUI. Además, se descubrió que la posición 102 tenía glicosilación deficiente cuando estaba en formato bivalente, pero buena glicosilación en formato trivalente.

En consecuencia, en otra realización, el DVUI N-terminal de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En una realización adicional, el DVUI C-terminal de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 19, 26, 55, 73, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

5 Como tal, en un aspecto adicional, la presente tecnología se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI, en donde el DVUI N-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

10 En una realización adicional, el DVUI C-terminal de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 19, 26, 55, 73, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

Como se mencionó anteriormente, los inventores descubrieron sorprendentemente que la posición 3 como sitio aceptor de glicosilación solo proporcionó buenos grados de glicosilación en un formato multivalente, incluido un polipéptido bivalente. Adicionalmente, encontraron que la posición 102 proporcionaba buenos grados de glicosilación en formato monovalente y multivalente, excepto el formato bivalente. Los otros sitios aceptores de glicosilación divulgados proporcionaron buenos grados de glicosilación tanto en formatos monovalentes como multivalentes, incluido un polipéptido bivalente.

En otro aspecto, dicho polipéptido según la presente tecnología comprende al menos tres DVUI. En una realización, al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

Los inventores se sorprendieron al descubrir que un sitio aceptor de glicosilación presente en el DVUI en la posición 15, dio como resultado un alto grado de glicosilación del DVUI, solo cuando el DVUI estaba en (al menos el) formato trivalente. Se observaron grados insuficientes de glicosilación con un sitio aceptor de glicosilación presente en un DVUI en la posición 15 cuando el DVUI estaba en un formato monovalente, y solo se observó un grado justo aceptable de glicosilación en formato bivalente. Sin embargo, cuando dicho DVUI se formateó en el polipéptido trivalente, se observaron grados sorprendentemente altos de glicosilación. Adicionalmente, los sitios aceptores de glicosilación presentes en el DVUI en las posiciones ya tratadas previamente 1, 3, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110 también proporcionaron altos grados de glicosilación cuando el DVUI estaba en (al menos el) formato trivalente.

30 En una realización, al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 15, 19, 26 y 105, según la numeración de Kabat.

Los inventores descubrieron sorprendentemente que cuando el sitio aceptor de glicosilación estaba en la posición de aminoácido 3, 15, 19, 26 o 105 en un polipéptido al menos trivalente, la ubicación del DVUI dentro del polipéptido no tenía ninguna influencia sobre el grado de glicosilación.

En otra realización, dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI. Como se ha mencionado anteriormente, la presencia en el DVUI de un sitio aceptor de glicosilación en la posición 15 proporcionó sorprendentemente altos grados de glicosilación en

un polipéptido trivalente. Adicionalmente, los sitios aceptores de glicosilación presentes en el DVUI en las posiciones 1, 3, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110 proporcionaron altos grados de glicosilación en un formato multivalente, incluido en un polipéptido trivalente.

Los inventores descubrieron sorprendentemente que, para el uso de algunas posiciones como sitios aceptores de glicosilación, la ubicación del DVUI en el polipéptido formateado tuvo un efecto sobre el grado de glicosilación obtenido, también en formato trivalente. Específicamente, en algunos casos, el grado de glicosilación dependía de si el DVUI con el sitio aceptor de glicosilación era el DVUI C-terminal, el DVUI N-terminal o un DVUI que no estaba ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal (es decir, un DVUI entre el DVUI C-terminal y el DVUI N-terminal, tal como el DVUI medio). Para el uso de las posiciones 3, 15, 19, 26, 55, 73, 105 y 108 como sitio aceptor de glicosilación, la ubicación del DVUI con el sitio aceptor de glicosilación en el polipéptido no tuvo ninguna influencia sobre el grado de glicosilación obtenido. Sin embargo, para el uso de las posiciones 53, 68, 75, 102 y 110 como sitio aceptor de glicosilación, los inventores descubrieron sorprendentemente que se obtuvo una glicosilación deficiente cuando el DVUI que comprende el sitio aceptor de glicosilación era el DVUI C-terminal. Adicionalmente, los inventores encontraron que un sitio aceptor de glicosilación en la posición 1 solo podía estar presente en el DVUI C-terminal para obtener altos grados de glicosilación. Para el uso de las posiciones 68, 75 y 110 como sitio aceptor de glicosilación, cualquier otra ubicación, además del C-terminal, del DVUI dentro del polipéptido daría como resultado un alto grado de glicosilación.

Por lo tanto, en una realización, el DVUI N-terminal de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 15, 19, 26, 55, 73, 75, 76, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

En otra realización, el DVUI C-terminal de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26 y 105, según la numeración de Kabat.

En otra realización más, al menos uno de los al menos tres DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

A continuación en el presente documento se proporcionan puntos específicos para cada sitio aceptor de glicosilación específico. No debe considerarse que la invención se limita a estos puntos.

Posición 1

Punto 1.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1, según la numeración de Kabat.

Punto 1.2. El polipéptido según el punto 1.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

Punto 1.3. El polipéptido según el punto 1.1 o 1.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación.

5 Punto 1.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 1.1-1.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

Punto 1.5. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 1.1-1.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

10 Punto 1.6. El polipéptido según el punto 1.5, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1.

15 Punto 1.7. El polipéptido según el punto 1.6, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1.

Punto 1.8. El polipéptido según el punto 1.5, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1, según la numeración de Kabat.

20 Punto 1.9. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 1.5-1.8, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

Punto 1.10. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 1.1-1.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

25 Punto 1.11. El polipéptido según el punto 1.10, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1.

30 Punto 1.12. El polipéptido según el punto 1.10, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal y medio restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1.

Punto 1.13. El polipéptido según el punto 1.10, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1.

35 Punto 1.14. El polipéptido según el punto 1.10, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1, según la numeración de Kabat.

Punto 1.15. El polipéptido según los puntos 1.10-1.14, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 3

5 Punto 3.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3, según la numeración de Kabat.

Punto 3.2. El polipéptido según el punto 3.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

10 Punto 3.3. El polipéptido según el punto 3.1 o 3.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 3, según la numeración de Kabat.

Punto 3.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 3.1-3.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

15 Punto 3.5. El polipéptido según el punto 3.4, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3.

20 Punto 3.6. El polipéptido según el punto 3.5, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3, según la numeración de Kabat, y el DVUI C-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3.

25 Punto 3.7. El polipéptido según el punto 3.5, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3.

Punto 3.8. El polipéptido según el punto 3.4, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glucosilación presente en la posición de aminoácido 3, según la numeración de Kabat.

30 Punto 3.9. El polipéptido según los puntos 3.4-3.8, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

Punto 3.10. El polipéptido según los puntos 3.1-3.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

35 Punto 3.11. El polipéptido según el punto 3.10, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3.

Punto 3.12. El polipéptido según el punto 3.11, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3, según la numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3.

5 Punto 3.13. El polipéptido según el punto 3.11, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 3.

10 Punto 3.14. El polipéptido según el punto 3.11, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal y medio restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3.

15 Punto 3.15. El polipéptido según el punto 3.10, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3.

Punto 3.16. El polipéptido según el punto 3.10, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3, según la numeración de Kabat.

20 Punto 3.17. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 3.10-3.16, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 15

25 Punto 15.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 15, según la numeración de Kabat.

Punto 15.2. El polipéptido según el punto 15.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

30 Punto 15.3. El polipéptido según el punto 15.1 o 15.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 15, según la numeración de Kabat.

Punto 15.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 15.1-15.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

35 Punto 15.5. El polipéptido según el punto 15.4, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 15, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 15.

Punto 15.6. El polipéptido según el punto 15.5, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 15, según la numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 15.

5 Punto 15.7. El polipéptido según el punto 15.5, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 15, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 15.

10 Punto 15.8. El polipéptido según el punto 15.5, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 15, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal y medio restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 15.

15 Punto 15.9. El polipéptido según el punto 15.4, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 15, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 15.

20 Punto 15.10. El polipéptido según el punto 15.4, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 15, según la numeración de Kabat.

Punto 15.11. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 15.4-15.10, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 19

25 Punto 19.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19, según la numeración de Kabat.

Punto 19.2. El polipéptido según el punto 19.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

30 Punto 19.3. El polipéptido según el punto 19.1 o 19.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 19, según la numeración de Kabat.

Punto 19.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 19.1-19.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

35 Punto 19.5. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 19.1-19.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

Punto 19.6. El polipéptido según el punto 19.5, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19, según la

numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19.

Punto 19.7. El polipéptido según el punto 19.6, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19, según la numeración de Kabat, y el DVUI C-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19.

Punto 19.8. El polipéptido según el punto 19.6, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19.

Punto 19.9. El polipéptido según el punto 19.5, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glucosilación presente en la posición de aminoácido 19, según la numeración de Kabat.

Punto 19.10. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 19.5-19.9, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

Punto 19.11. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 19.1-19.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

Punto 19.12. El polipéptido según el punto 19.11, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19.

Punto 19.13. El polipéptido según el punto 19.12, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19, según la numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19.

Punto 19.14. El polipéptido según el punto 19.12, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 19.

Punto 19.15. El polipéptido según el punto 19.12, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal y medio restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19.

Punto 19.16. El polipéptido según el punto 19.11, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19.

Punto 19.17. El polipéptido según el punto 19.11, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19, según la numeración de Kabat.

5 Punto 19.18. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 19.11-19.17, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 26

Punto 26.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26, según la numeración de Kabat.

10 Punto 26.2. El polipéptido según el punto 26.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

15 Punto 26.3. El polipéptido según el punto 26.1 o 26.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 26, según la numeración de Kabat.

Punto 26.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 26.1-26.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

Punto 26.5. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 26.1-26.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

20 Punto 26.6. El polipéptido según el punto 26.5, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26.

25 Punto 26.7. El polipéptido según el punto 26.6, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26, según la numeración de Kabat, y el DVUI C-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26.

30 Punto 26.8. El polipéptido según el punto 26.6, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26.

Punto 26.9. El polipéptido según el punto 26.5, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glucosilación presente en la posición de aminoácido 26, según la numeración de Kabat.

35 Punto 26.10. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 26.5-26.9, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

Punto 26.11. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 26.1-26.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

Punto 26.12. El polipéptido según el punto 26.11, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26.

5 Punto 26.13. El polipéptido según el punto 26.12, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26, según la numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26.

10 Punto 26.14. El polipéptido según el punto 26.12, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 26.

15 Punto 26.15. El polipéptido según el punto 26.12, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal y medio restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26.

20 Punto 26.16. El polipéptido según el punto 26.11, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26.

Punto 26.17. El polipéptido según el punto 26.11, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26, según la numeración de Kabat.

25 Punto 26.18. El polipéptido según los puntos 26.11-26.17, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 53

30 Punto 53.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53, según la numeración de Kabat.

Punto 53.2. El polipéptido según el punto 53.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

35 Punto 53.3. El polipéptido según el punto 53.1 o 53.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 53, según la numeración de Kabat.

Punto 53.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 53.1-53.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

Punto 53.5. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 53.1-53.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

5 Punto 53.6. El polipéptido según el punto 53.5, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53.

10 Punto 53.7. El polipéptido según el punto 53.6, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53, según la numeración de Kabat, y el DVUI C-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53.

Punto 53.8. El polipéptido según el punto 53.5, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glucosilación presente en la posición de aminoácido 53, según la numeración de Kabat.

15 Punto 53.9. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 53.5-53.8, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

Punto 53.10. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 53.1-53.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

20 Punto 53.11. El polipéptido según el punto 53.10, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53.

25 Punto 53.12. El polipéptido según el punto 53.11, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53, según la numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53.

30 Punto 53.13. El polipéptido según el punto 53.11, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 53.

Punto 53.14. El polipéptido según el punto 53.10, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53.

35 Punto 53.15. El polipéptido según el punto 53.10, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53, según la numeración de Kabat.

Punto 53.16. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 53.10-53.15, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 55

5 Punto 55.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55, según la numeración de Kabat.

Punto 55.2. El polipéptido según el punto 55.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

10 Punto 55.3. El polipéptido según el punto 55.1 o 55.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 55, según la numeración de Kabat.

Punto 55.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 55.1-55.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

15 Punto 55.5. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 55.1-55.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

Punto 55.6. El polipéptido según el punto 55.5, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55.

20 Punto 55.7. El polipéptido según el punto 55.6, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55, según la numeración de Kabat, y el DVUI C-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55.

25 Punto 55.8. El polipéptido según el punto 55.6, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55.

30 Punto 55.9. El polipéptido según el punto 55.5, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glucosilación presente en la posición de aminoácido 55, según la numeración de Kabat.

Punto 55.10. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 55.5-55.9, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

35 Punto 55.11. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 55.1-55.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

Punto 55.12. El polipéptido según el punto 55.11, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55, según la

numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55.

Punto 55.13. El polipéptido según el punto 55.12, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55, según la numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55.

Punto 55.14. El polipéptido según el punto 55.12, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 55.

Punto 55.15. El polipéptido según el punto 55.12, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal y medio restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55.

Punto 55.16. El polipéptido según el punto 55.11, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55.

Punto 55.17. El polipéptido según el punto 55.11, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55, según la numeración de Kabat.

Punto 55.18. El polipéptido según los puntos 55.11-55.17, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 68

Punto 68.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68, según la numeración de Kabat.

Punto 68.2. El polipéptido según el punto 68.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

Punto 68.3. El polipéptido según el punto 68.1 o 68.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 68, según la numeración de Kabat.

Punto 68.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 68.1-68.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

Punto 68.5. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 68.1-68.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

Punto 68.6. El polipéptido según el punto 68.5, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68.

5 Punto 68.7. El polipéptido según el punto 68.6, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68, según la numeración de Kabat, y el DVUI C-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68.

10 Punto 68.8. El polipéptido según el punto 68.5, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glucosilación presente en la posición de aminoácido 68, según la numeración de Kabat.

Punto 68.9. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 68.5-68.9, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

15 Punto 68.10. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 68.1-68.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

Punto 68.11. El polipéptido según el punto 68.10, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68.

20 Punto 68.12. El polipéptido según el punto 68.11, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68, según la numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68.

25 Punto 68.13. El polipéptido según el punto 68.11, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 68.

30 Punto 68.14. El polipéptido según el punto 68.10, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68.

35 Punto 68.15. El polipéptido según el punto 68.10, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68, según la numeración de Kabat.

Punto 68.15. El polipéptido según los puntos 68.10-68.15, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 73

Punto 73.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73, según la numeración de Kabat.

5 Punto 73.2. El polipéptido según el punto 73.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

Punto 73.3. El polipéptido según los puntos 73.1 o 73.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 73, según la numeración de Kabat.

10 Punto 73.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 73.1-73.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

Punto 73.5. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 73.1-73.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

15 Punto 73.6. El polipéptido según el punto 73.5, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73.

20 Punto 73.7. El polipéptido según el punto 73.6, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73, según la numeración de Kabat, y el DVUI C-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73.

25 Punto 73.8. El polipéptido según el punto 73.6, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73.

Punto 73.9. El polipéptido según el punto 73.5, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glucosilación presente en la posición de aminoácido 73, según la numeración de Kabat.

30 Punto 73.10. El polipéptido según los puntos 73.5-73.9, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

Punto 73.11. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 73.1-73.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

35 Punto 73.12. El polipéptido según el punto 73.11, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73.

Punto 73.13. El polipéptido según el punto 73.12, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73, según la

numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73.

Punto 73.14. El polipéptido según el punto 73.12, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 73.

Punto 73.15. El polipéptido según el punto 73.12, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal y medio restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73.

Punto 73.16. El polipéptido según el punto 73.11, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73.

Punto 73.17. El polipéptido según el punto 73.11, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73, según la numeración de Kabat.

Punto 73.18. El polipéptido según los puntos 73.11-73.17, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 75

Punto 75.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75, según la numeración de Kabat.

Punto 75.2. El polipéptido según el punto 75.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

Punto 75.3. El polipéptido según el punto 75.1 o 75.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 75, según la numeración de Kabat.

Punto 75.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 75.1-75.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

Punto 75.5. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 75.1-75.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

Punto 75.6. El polipéptido según el punto 75.5, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75.

Punto 75.7. El polipéptido según el punto 75.6, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75, según la numeración de Kabat, y el DVUI C-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75.

5 Punto 75.8. El polipéptido según el punto 75.5, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glucosilación presente en la posición de aminoácido 75, según la numeración de Kabat.

Punto 75.9. El polipéptido según los puntos 75.5-75.8, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

10 Punto 75.10. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 75.1-75.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

Punto 75.11. El polipéptido según el punto 75.10, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75.

15 Punto 75.12. El polipéptido según el punto 75.11, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75, según la numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75.

20 Punto 75.13. El polipéptido según el punto 75.11, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 75.

25 Punto 75.14. El polipéptido según el punto 75.10, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75.

30 Punto 75.15. El polipéptido según el punto 75.10, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75, según la numeración de Kabat.

Punto 75.16. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 75.10-75.15, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 76

35 Punto 76.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76, según la numeración de Kabat.

Punto 76.2. El polipéptido según el punto 76.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

Punto 76.3. El polipéptido según el punto 76.1 o 76.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 76, según la numeración de Kabat.

Punto 76.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 76.1-76.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

Punto 76.5. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 76.1-76.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

Punto 76.6. El polipéptido según el punto 76.5, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76.

Punto 76.7. El polipéptido según el punto 76.6, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76, según la numeración de Kabat, y el DVUI C-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76.

Punto 76.8. El polipéptido según el punto 76.6, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76.

Punto 76.9. El polipéptido según el punto 76.5, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glucosilación presente en la posición de aminoácido 76, según la numeración de Kabat.

Punto 76.10. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 76.5-76.9, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

Punto 76.11. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 76.1-76.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

Punto 76.12. El polipéptido según el punto 76.11, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76.

Punto 76.13. El polipéptido según el punto 76.12, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76, según la numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76.

Punto 76.14. El polipéptido según el punto 76.12, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 76.

Punto 76.15. El polipéptido según el punto 76.12, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal y medio restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76.

Punto 76.16. El polipéptido según el punto 76.11, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76.

Punto 76.17. El polipéptido según el punto 76.11, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76, según la numeración de Kabat.

Punto 76.18. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 76.11-76.17, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 102

Punto 102.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 102, según la numeración de Kabat.

Punto 102.2. El polipéptido según el punto 1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

Punto 102.3. El polipéptido según el punto 102.1 o 102.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 102, según la numeración de Kabat.

Punto 102.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 102.1-102.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

Punto 102.5 El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 102.1-102.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

Punto 102.6. El polipéptido según el punto 102.5, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 102, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 102.

Punto 102.7. El polipéptido según el punto 102.6, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de

glicosilación presente en la posición de aminoácido 102, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 102.

5 Punto 102.8. El polipéptido según el punto 102.6, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 102, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal y medio restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 102.

10 Punto 102.9. El polipéptido según el punto 102.5, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 102, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 102.

Punto 102.10. El polipéptido según el punto 102.5, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 102, según la numeración de Kabat.

15 Punto 102.11. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 102.5-102.10, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 105

20 Punto 105.1. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105, según la numeración de Kabat.

Punto 105.2. El polipéptido según el punto 105.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

25 Punto 105.3. El polipéptido según el punto 105.1 o 105.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 105, según la numeración de Kabat.

Punto 105.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 105.1-105.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

30 Punto 105.5. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 105.1-105.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

Punto 105.6. El polipéptido según el punto 105.5, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105.

35 Punto 105.7. El polipéptido según el punto 105.6, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105, según la numeración de Kabat, y el DVUI C-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105.

Punto 105.8. El polipéptido según el punto 105.6, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105.

5 Punto 105.9. El polipéptido según el punto 105.5, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glucosilación presente en la posición de aminoácido 105, según la numeración de Kabat.

Punto 105.10. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 105.5-105.9, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

10 Punto 105.11. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 105.1-105.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

Punto 105.12. El polipéptido según el punto 105.11, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105.

Punto 105.13. El polipéptido según el punto 105.12, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105, según la numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105.

20 Punto 105.14. El polipéptido según el punto 105.12, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 105.

25 Punto 105.15. El polipéptido según el punto 105.12, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal y medio restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105.

30 Punto 105.16. El polipéptido según el punto 105.11, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105.

Punto 105.17. El polipéptido según el punto 105.11, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105, según la numeración de Kabat.

35 Punto 105.18. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 105.11-105.17, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 108

Punto 108.1. El polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108, según la numeración de Kabat.

5 Punto 108.2. El polipéptido según el punto 108.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

Punto 108.3. El polipéptido según el punto 108.1 o 108.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 108, según la numeración de Kabat.

10 Punto 108.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 108.1-108.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

Punto 108.5. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 108.1-108.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

15 Punto 108.6. El polipéptido según el punto 108.5, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108.

20 Punto 108.7. El polipéptido según el punto 108.6, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108, según la numeración de Kabat, y el DVUI C-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108.

25 Punto 108.8. El polipéptido según el punto 108.6, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108.

Punto 108.9. El polipéptido según el punto 108.5, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glucosilación presente en la posición de aminoácido 108, según la numeración de Kabat.

30 Punto 108.10. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 108.5-108.9, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

Punto 108.11. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 108.1-108.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

35 Punto 108.12. El polipéptido según el punto 108.11, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108.

Punto 108.13. El polipéptido según el punto 108.12, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108,

según la numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108.

Punto 108.14. El polipéptido según el punto 108.12, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 108.

Punto 108.15. El polipéptido según el punto 108.12, en donde sólo el DVUI C-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108, según la numeración de Kabat, y el DVUI N-terminal y medio restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108.

Punto 108.16. El polipéptido según el punto 108.11, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108.

Punto 108.17. El polipéptido según el punto 108.11, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108, según la numeración de Kabat.

Punto 108.18. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 108.11-108.17, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Posición 110

Punto 110.1. El polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110, según la numeración de Kabat.

Punto 110.2. El polipéptido según el punto 110.1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

Punto 110.3. El polipéptido según el punto 110.1 o 110.2, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación y está presente en la posición de aminoácido 110, según la numeración de Kabat.

Punto 110.4. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 110.1-110.3, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

Punto 110.5. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 110.1-110.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos dos DVUI.

Punto 110.6. El polipéptido según el punto 110.5, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110.

Punto 110.7. El polipéptido según el punto 110.6, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110, según la numeración de Kabat, y el DVUI C-terminal restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110.

5 Punto 110.8. El polipéptido según el punto 110.5, en donde ambos de dichos al menos dos DVUI comprenden un sitio aceptor de glucosilación presente en la posición de aminoácido 110, según la numeración de Kabat.

Punto 110.9. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 110.5-110.8, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

10 Punto 110.10. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 110.1-110.3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI.

Punto 110.11. El polipéptido según el punto 110.10, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110, según la numeración de Kabat, y los dos DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110.

Punto 110.12. El polipéptido según el punto 110.11, en donde sólo el DVUI N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110, según la numeración de Kabat, y los DVUI medio y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110.

20 Punto 110.13. El polipéptido según el punto 110.11, en donde solo un DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal de los al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110, según la numeración de Kabat, y los DVUI N-terminal y C-terminal restantes no comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácidos 110.

25 Punto 110.14. El polipéptido según el punto 110.10, en donde al menos dos de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110, según la numeración de Kabat, y el DVUI restante no comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110.

Punto 110.15. El polipéptido según el punto 110.10, en donde los tres de los al menos tres DVUI comprenden un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110, según la numeración de Kabat.

Punto 110.16. El polipéptido según uno cualquiera de los puntos 110.10-110.15, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Combinaciones de sitios aceptores de glicosilación

35 Punto A. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 1, en combinación con al menos un sitio

aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

5 Punto B. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 3, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

10 Punto C. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 15, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

15 Punto D. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 19, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 15, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

20 Punto E. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 26, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 15, 19, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

25 Punto F. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 53, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 15, 19, 26, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

30 Punto G. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 55, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 15, 19, 26, 53, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

35 Punto H. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 68, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

Punto I. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 73, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 75, 76, 102, 105, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

Punto J. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 75, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 76, 102, 105, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

Punto K. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 76, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 102, 105, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

Punto L. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 102, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 105, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

Punto M. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 105, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 108 y/o 110, según la numeración de Kabat.

Punto N. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 108, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105 y/o 110, según la numeración de Kabat.

Punto O. Un polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en la posición de aminoácido 110, en combinación con al menos un sitio aceptor de glicosilación adicional presente en cualquiera de las posiciones 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105 y/o 108, según la numeración de Kabat.

3. Glicoproteínas de DVUI

El sitio aceptor de glicosilación presente en los polipéptidos se puede modificar (pero no necesariamente) con un glicano ligado a N o a O. La presente tecnología también se refiere a los

polipéptidos de la presente tecnología que se glicosilan en uno o más de los sitios aceptores de glicosilación especificados. Tras la expresión de un polipéptido con dicho sitio aceptor de glicosilación en un hospedador o célula hospedadora capaz de glicosilar polipéptidos (como se define adicionalmente en el presente documento), el polipéptido producido se modificará directamente en el hospedador o célula hospedadora con uno o más glicanos. El polipéptido glucosilado obtenido, también denominado en el presente documento glicoproteína de DVUI, comprende uno o más glicanos. En una realización, el polipéptido puede comprender uno o más glicanos con una N-acetil glucosamina (GlcNAc) terminal, una manosa (terminal), un ácido siálico (terminal), una galactosa (terminal) o una combinación de los mismos. Como tal, la presente tecnología proporciona un polipéptido que comprende un DVUI como se describe en el presente documento, en donde el polipéptido se glicosila con uno o más glicanos seleccionados de N-acetil glucosamina (GlcNAc), manosa, galactosa, fucosa y ácido siálico.

En algunas realizaciones, las glicoproteínas de DVUI de la presente tecnología muestran una alta afinidad. En algunas realizaciones, las glicoproteínas de DVUI de la presente tecnología tienen la misma afinidad en comparación con el polipéptido sin la glicosilación en el sitio aceptor de glicosilación especificado.

La afinidad es una medida de la fuerza de unión entre un resto y un sitio de unión en la molécula diana: cuanto menor sea el valor de la constante de disociación (K_D), mayor será la fuerza de unión entre una molécula diana y un resto de direccionamiento. Normalmente, las unidades de unión utilizadas en la presente tecnología, tales como DVUI, se unirán a sus dianas con una K_D de 10^{-5} a 10^{-12} mol/litro o menos, 10^{-7} a 10^{-12} mol/litro o menos, o de 10^{-8} a 10^{-12} mol/litro (es decir, con una constante de asociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litro/mol o más, 10^7 a 10^{12} litro/mol o más, o de 10^8 a 10^{12} litro/mol). Cualquier valor de K_D superior a 10^{-4} mol/litro (o cualquier valor de K_A inferior a 10^4 litro/mol) se considera generalmente indicativo de unión inespecífica. Las K_D para interacciones biológicas, tales como la unión de secuencias de inmunoglobulina a un antígeno, que se consideran específicas suelen estar en el intervalo de 10^{-5} mol/litro (10000 nM o 10 μ M) a 10^{-12} mol/litro (0.001 nM o 1 pM) o menos.

La constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente, como será evidente para el experto. Los procedimientos para determinar la constante de disociación serán evidentes para el experto y, por ejemplo, incluyen las técnicas mencionadas a continuación. A este respecto, también quedará claro que puede no ser posible medir constantes de disociación de más de 10^{-4} mol/litro o 10^{-3} mol/litro (p. ej., de 10^{-2} mol/litro). Opcionalmente, como también será evidente para el experto, la constante de disociación (real o aparente) puede calcularse a partir de la constante de asociación (real o aparente), mediante la relación [$K_D = 1/K_A$].

La afinidad de una interacción molecular entre dos moléculas puede medirse mediante diferentes técnicas conocidas per se, como la conocida técnica de biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) (véase, por ejemplo, Ober et al. 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559). La expresión "resonancia de plasmones superficiales", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biospecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, donde una molécula se inmoviliza

en el chip de biosensor y la otra molécula pasa por encima de la molécula inmovilizada en condiciones de flujo, lo que produce mediciones de k_{on} , k_{off} y, por lo tanto, valores de K_D (o K_A). Esto puede realizarse, por ejemplo, utilizando el conocido sistema BIAcore® (BIAcore International AB, una empresa de GE Healthcare, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para más descripciones, véase Jonsson et al. (1993, Ann. Biol. Clin. 51: 19-26), Jonsson et al. 1991 (Biotechniques 11: 620-627), Johnsson et al. 1995 (J. Mol. Recognit. 8: 125-131), y Johnsson et al. 1991 (Anal. Biochem. 198: 268-277).

Otra técnica de biosensores bien conocida para determinar afinidades de interacciones biomoleculares es la interferometría de biocapa (BLI) (véase, por ejemplo, Abdiche et al. 2008, Anal. Biochem. 377: 209-217). La expresión "interferometría de biocapa" o "BLI", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una técnica óptica sin marcadores que analiza el patrón de interferencia de la luz reflejada desde dos superficies: una capa de referencia interna (haz de referencia) y una capa de proteína inmovilizada en la punta del biosensor (haz de señal). Un cambio en el número de moléculas unidas a la punta del biosensor provoca un cambio en el patrón de interferencia, que se notifica como un cambio de longitud de onda (nm), cuya magnitud es una medida directa del número de moléculas unidas a la superficie de la punta del biosensor. Dado que las interacciones pueden medirse en tiempo real, pueden determinarse las tasas de asociación y disociación y las afinidades. La BLI puede realizarse, por ejemplo, utilizando los conocidos sistemas Octet® (ForteBio, una división de Pall Life Sciences, Menlo Park, Estados Unidos).

Como alternativa, las afinidades pueden medirse en un ensayo cinético de exclusión (KinExA) (véase, por ejemplo, Drake et al. 2004, Anal. Biochem. 328: 35-43) utilizando la plataforma KinExA® (Sapidyne Instruments Inc, Boise, Estados Unidos). El término "KinExA", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un procedimiento basado en soluciones para medir la verdadera afinidad de unión en equilibrio y la cinética de moléculas no modificadas. Las soluciones equilibradas de un complejo anticuerpo/antígeno se hacen pasar por una columna con perlas recubiertas previamente con antígeno (o anticuerpo), permitiendo que el anticuerpo (o antígeno) libre se una a la molécula aplicada como recubrimiento. La detección del anticuerpo (o antígeno) capturado de este modo se realiza con una proteína marcada con fluorescencia que se une al anticuerpo (o antígeno).

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

En algunas realizaciones, los polipéptidos glicosilados de la presente tecnología se unen específicamente a su diana con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} mol/litro o menos, de 10^{-7} a 10^{-12} mol/litro o menos, o de 10^{-8} a 10^{-12} mol/litro, según se determina por resonancia de plasmones superficiales. En algunas realizaciones, los polipéptidos glicosilados de la presente tecnología se unen específicamente a su diana con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} mol/litro o menos, de 10^{-7} a 10^{-12} mol/litro o menos, o de 10^{-8} a 10^{-12} mol/litro, según se determina por Meso Scale Discovery.

En algunas realizaciones, las glicoproteínas de DVUI de la presente tecnología tienen (esencialmente) la misma temperatura de fusión (T_m) o una mayor en comparación con el polipéptido sin la glicosilación en el sitio aceptor de glicosilación especificado. El punto medio de desnaturalización de una proteína se define como la temperatura (T_m) o concentración de desnaturalizante a la que tanto los estados

plegados como los desplegados están igualmente poblados en equilibrio (asumiendo el plegamiento de proteínas de dos estados). La T_m a menudo se determina utilizando un ensayo de cambio térmico, tal como el ensayo de desplazamiento térmico descrito en la sección de Ejemplos de la presente solicitud. La temperatura de fusión se define como la temperatura de una proteína a la que se despliega el 50 % de dicha proteína.

Los componentes, por ejemplo, los DVUI, presentes en el polipéptido pueden estar unidos entre sí por uno o más enlazadores adecuados, tales como enlazadores peptídicos. El uso de enlazadores para conectar dos o más (poli) péptidos es bien conocido en la técnica. Una clase de enlazador peptídico utilizada a menudo se conoce como los enlazadores "Gly-Ser" o "GS". Se trata de enlazadores que consisten esencialmente en restos de glicina (G) y serina (S), y suelen comprender una o más repeticiones de un motivo peptídico, tal como el motivo GGGGS (SEQ ID NO: 150) (por ejemplo, que presenta la fórmula (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) $_n$ en la que n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más). Algunos ejemplos normalmente usados de dichos enlazadores GS son los enlazadores 9GS (GGGGSGGGGS, SEQ ID NO: 151), los enlazadores 15GS ($n=3$; SEQ ID NO: 152) y enlazadores 35GS ($n=7$; SEQ ID NO: 153). Se hace referencia, por ejemplo, a Chen *et al.* 2013 (Adv. Drug Deliv. Rev. 65(10): 1357-1369) y Klein *et al.* 2014 (Protein Eng. Des. Sel. 27(10): 325-330). En una realización del polipéptido de la presente tecnología, se utilizan enlazadores 9GS para unir los componentes del polipéptido entre sí. En una realización del polipéptido de la presente tecnología, se utilizan enlazadores 35GS para unir los componentes del polipéptido entre sí.

La presente tecnología también proporciona DVUI y polipéptidos de secuencia optimizada que muestran una mayor estabilidad tras el almacenamiento durante los estudios de estabilidad. Los DVUI y polipéptidos de secuencia optimizada muestran una modificación postraducciona reducida de piroglutamato del N-terminal y, por lo tanto, tienen una mayor estabilidad del producto. La modificación del piroglutamato provoca la heterogeneidad del producto final y debe evitarse. La posibilidad de modificación postraducciona pGlu del N-terminal se eliminó cambiando el ácido glutámico N-terminal (E) por un ácido aspártico (D), lo que condujo a una mayor estabilidad del producto. En consecuencia, la presente invención también se refiere a DVUI y polipéptidos como los descritos anteriormente en donde el ácido glutámico en la posición 1 (dicha posición determinada de acuerdo con la numeración de Kabat) se cambia por un ácido Aspártico (E1D).

La presente tecnología también proporciona DVUI y polipéptidos de secuencia optimizada que están "humanizados", es decir, en los que uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia VHH natural (y en particular en las secuencias marco) se sustituyen por uno o más de los restos de aminoácidos que se producen en la posición o posiciones correspondientes en un dominio VH de un anticuerpo convencional de 4 cadenas de un ser humano (por ejemplo, indicado anteriormente). En consecuencia, la presente invención también se refiere a DVUI y polipéptidos como los descritos anteriormente que están humanizados.

La presente tecnología también proporciona DVUI y polipéptidos de secuencia optimizada que muestran una unión reducida por anticuerpos preexistentes presentes en el suero humano. Para ello, en una realización, el polipéptido comprende una valina (V) en la posición de aminoácido 11 y una leucina (L)

en la posición de aminoácido 89 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos un DVUI. En una realización, el polipéptido comprende una valina (V) en la posición de aminoácido 11 y una leucina (L) en la posición de aminoácido 89 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en cada ISVD. En consecuencia, la presente tecnología también se refiere a DVUI y polipéptidos como los descritos anteriormente que han sido optimizados en secuencia con una valina (V) en la posición de aminoácido 11 y una leucina (L) en la posición de aminoácido 89 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos un DVUI, tal como en todos los DVUI.

En una realización, el DVUI o polipéptido tiene un extremo C-terminal con la secuencia VTVSS(X)_n (SEQ ID NO: 154), en donde n es de 1 a 10, preferentemente de 1 a 5, como por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5, y en donde cada X es un residuo de aminoácido seleccionado de manera independiente. En una realización, el polipéptido comprende dicho ISVD en su extremo C-terminal. En una realización, n es 1 o 2, tal como 1. En una realización, X es un aminoácido de origen natural. En una realización, X se selecciona del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I).

En otra realización, el polipéptido comprende una lisina (K) o una glutamina (Q) en la posición 110 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos un DVUI. En otra realización, el DVUI comprende una lisina (K) o glutamina (Q) en la posición 112 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos un DVUI. En algunas realizaciones, el extremo C-terminal del ISVD es VKVSS (SEQ ID NO: 155), VQVSS (SEQ ID NO: 156), VTVKS (SEQ ID NO: 157), VTVQS (SEQ ID NO: 158), VKVKS (SEQ ID NO: 159), VKVQS (SEQ ID NO: 160), VQVKS (SEQ ID NO: 161) o VQVQS (SEQ ID NO: 162), de modo que, tras la adición de una alanina única, el extremo C-terminal del polipéptido comprende, por ejemplo, la secuencia VTVSSA (SEQ ID NO: 163), VKVSSA (SEQ ID NO: 164), VQVSSA (SEQ ID NO: 165), VTVKSA (SEQ ID NO: 166), VTVQSA (SEQ ID NO: 167), VKVKSA (SEQ ID NO: 168), VKVQSA (SEQ ID NO: 169), VQVKSA (SEQ ID NO: 170) o VQVQSA (SEQ ID NO: 171). En una realización, el polipéptido comprende una valina (V) en la posición de aminoácido 11 y una leucina (L) en la posición de aminoácido 89 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en cada DVUI, opcionalmente una lisina (K) o glutamina (Q) en la posición 110 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos un DVUI, y comprende una extensión de 1 a 5 aminoácidos (de origen natural) (de acuerdo con la definición anterior), tal como una única extensión de alanina (A), en el C-terminal del DVUI C-terminal, de manera que el C-terminal del polipéptido comprende, por ejemplo, la secuencia VTVSSA (SEQ ID NO: 163), VKVSSA (SEQ ID NO: 164) o VQVSSA (SEQ ID NO: 165). Véanse, p. ej., los documentos WO2012/175741 y WO2015/173325 para más información al respecto.

Se proporcionan algunas realizaciones para las glicoproteínas de DVUI que tenían grados de glicosilación particularmente altos cuando el sitio aceptor de glicosilación en el DVUI es como se describe en el presente documento.

En un aspecto de la presente tecnología, la glicoproteína de DVUI es un polipéptido monovalente, en donde la secuencia del polipéptido se selecciona de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 73-78, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89-91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, y SEQ ID NO: 177-179.

En otro aspecto de la presente tecnología, la glicoproteína de DVUI es un polipéptido bivalente, en donde la secuencia del polipéptido se selecciona de SEQ ID NO: 99-102, SEQ ID NO: 105-108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 116-118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123-125, SEQ ID NO: 128-133, SEQ ID NO: 141-143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183 y SEQ ID NO: 187.

En un aspecto adicional de la presente tecnología, la glicoproteína de DVUI es un polipéptido trivalente, en donde la secuencia del polipéptido se selecciona de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22-24, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44-52, SEQ ID NO: 55-57, SEQ ID NO: 59-61, SEQ ID NO: 63-65, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 190 y SEQ ID NO: 191.

4. Conjugados

La presente tecnología también se refiere a un conjugado que comprende un polipéptido según la presente tecnología y un resto conjugado, que está conjugado con el glicano. Los polipéptidos modificados con glicanos en los sitios aceptores de glicosilación especificados son un punto de partida ideal para la conjugación basada en glicanos debido a su alto grado de glicosilación.

La conjugación se puede realizar químicamente (por ejemplo, utilizando oxidación con peryodato del componente glicano y conjugación posterior a través de métodos conocidos en la técnica, tales como ligación de oximas, ligación de hidrazona o mediante aminación reductora) o enzimáticamente (por ejemplo, utilizando galactosa oxidasa para oxidar galactosa y conjugación posterior mediante ligación de oximas, ligación de hidrazona o mediante aminación reductora). Como alternativa, se pueden incorporar residuos de glicanos marcados para permitir reacciones de conjugación posteriores (por ejemplo, incorporación de GalNAz en la cadena de glicanos utilizando una galactosiltransferasa mutante, y posterior reacción de conjugación mediante química clic).

En determinadas realizaciones, el conjugado comprende un enlazador entre el glicano y el resto conjugado. El uso de un enlazador específico dependerá de la aplicación y resultará evidente para una persona experta en la materia. Por ejemplo, las oximas e hidrazonas, en particular derivadas de aldehídos alifáticos, muestran menos estabilidad con el tiempo en agua o a un pH más bajo. Las estructuras estabilizadas aromáticamente pueden ser más útiles para unir de manera estable un glicano a un resto conjugado. Dichos enlazadores estabilizados también están dentro del alcance de la presente solicitud, ya que pueden limitar los efectos adversos debidos a la liberación prematura del resto conjugado, particularmente cuando el resto conjugado es una sustancia tóxica, por ejemplo, destinada a la destrucción de una célula tumoral. De particular interés son los REACTIVOS BICICLO[6.1.0]NON-4-INO, así como los enlazadores triazol estabilizados aromáticamente y los enlazadores sulfamida. Está dentro del conocimiento técnico común que el aumento de la estabilidad de un conjugado también puede resultar de una tendencia reducida a la agregación de cualquiera de los restos comprendidos dentro de dicho conjugado. Para la producción de conjugados de DVUI con mayor estabilidad, el lector se refiere no exclusivamente a los documentos WO2013036748, WO2014065661, WO2015057064 y WO2016053107, así como a otras solicitudes de patente presentadas por Synaffix B.V.

Se pueden utilizar diversos enlazadores conocidos en la técnica para enlazar el polipéptido glicosilado y el resto conjugado. Como debe quedar claro, se pueden emplear enlazadores escindibles y no escindibles para lograr el perfil de liberación deseado. En general, la combinación óptima de enlazador y química de conjugación debe adaptarse de manera única para correlacionar cada faceta única: el polipéptido glicosilado, el resto conjugado y el perfil de la enfermedad a tratar. Para revisiones sobre conjugados anticuerpo-fármaco y enlazadores utilizados en el presente documento, véase, por ejemplo, McCombs y Owen 2015 (AAPS J. 17(2), 2015) y Lu *et al.* 2016 (Int. J. Mol. Sci. 17(4): 561); doi: 10.3390/ijms17040561) y Pillow *et al.* 2017 (Pharm Pat Anal. 6(1)) que describen un novedoso enlazador de sales de amonio cuaternario útil en conjugados para el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas.

Otros enlazadores adecuados generalmente comprenden compuestos orgánicos o polímeros, en particular los adecuados para su uso en polipéptidos para uso farmacéutico. Por ejemplo, se han utilizado restos de poli(etilenglicol) para unir dominios de anticuerpos, véase, por ejemplo, el documento WO 04/081026. El alcance de la invención abarca que la longitud, el grado de flexibilidad y/u otras propiedades del enlazador puedan influir en las propiedades del conjugado final, incluyendo, entre otras, la afinidad, la especificidad o la avidéz por una diana específica. Basándose en la divulgación en el presente documento, el experto podrá determinar el enlazador óptimo para su uso en un conjugado específico, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

En algunas realizaciones, el conjugado que comprende un polipéptido según la presente tecnología y un resto conjugado tiene al menos una función o propiedad adicional en comparación con el polipéptido no conjugado. Por ejemplo, un conjugado que comprende un polipéptido de la presente tecnología y un fármaco citotóxico que es el resto conjugado da como resultado la formación de un polipéptido de unión con citotoxicidad del fármaco como segunda función (es decir, además de la unión a antígeno conferida por el DVUI comprendido en el polipéptido). Como otro ejemplo, la conjugación de un segundo polipéptido de unión al polipéptido de la presente tecnología puede conferir propiedades de unión adicionales. Como ejemplo adicional, el resto conjugado puede ser otro resto de azúcar, tal como glucosa, que proporciona una función de transporte de glucosa (Ancey *et al.* 2018, FEBS J. 285: 2926) o bis-manosa-6-fosfato que proporciona función de degradación. Como otro ejemplo más, el resto conjugado puede ser una molécula de PEG, proporcionando función de extensión de la semivida y/o estabilizante/solubilizante. Como otro ejemplo, el resto conjugado puede ser una quimera dirigida a proteólisis (PROTAC), proporcionando una función de degradación (Sakamoto *et al.* 2001, PNAS 98: 8554–9). Como ejemplo adicional, el resto conjugado puede ser un resto terapéutico (por ejemplo, antifúngico, antibacteriano, antiviral, antiparasitario, citotóxico, radionucleótido), proporcionando una función terapéutica. Otros restos que pueden conjugarse con los glicanos presentes en el sitio aceptor de glicosilación incluyen restos que prolongan la semivida (PEG o miméticos de PEG, polisacáridos grandes), unidades de detección (unidades de cromóforo, unidades fluorescentes, unidades fosforescentes, unidades luminiscentes, unidades de absorción de luz, unidades radiactivas), restos de direccionamiento (p. ej., moléculas pequeñas, anticuerpos).

5. Moléculas de ácido nucleico

Otro aspecto de la presente tecnología se refiere a una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que codifica un polipéptido según la presente tecnología.

Una "*molécula de ácido nucleico*" (utilizado indistintamente con "*ácido nucleico*") es una cadena de monómeros de nucleótidos unidos entre sí a través de una cadena principal de fosfato para formar una secuencia de nucleótidos. Un ácido nucleico puede utilizarse para transformar/transfectar una célula hospedadora u organismo hospedador, por ejemplo, para la expresión y/o producción de un polipéptido. Los hospedadores o células hospedadoras adecuados con fines de producción serán evidentes para el experto, son preferiblemente un organismo hospedador que puede glicosilar el polipéptido, y pueden ser, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado. Un hospedador o célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente tecnología también está abarcado por la presente tecnología.

Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN, ARN o un híbrido de los mismos, y también puede comprender nucleótidos modificados (por ejemplo, químicamente), tales como PNA. Puede ser monocatenario o bicatenario. En una forma de realización, se encuentra en forma de ADN bicatenario. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de la presente tecnología pueden ser ADN genómico o ADNc.

Los ácidos nucleicos de la presente tecnología se pueden preparar u obtener de una manera conocida en sí misma, y/o se pueden aislar de una fuente natural adecuada. Las secuencias de nucleótidos que codifican (poli)péptidos de origen natural pueden someterse, por ejemplo, a mutagénesis dirigida al sitio, con el fin de obtener una molécula de ácido nucleico que codifique el polipéptido con variación de secuencia. Además, como será evidente para el experto, para preparar un ácido nucleico, o pueden unirse de manera adecuada varias secuencias de nucleótidos, tales como al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de direccionamiento y, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican uno o más enlazadores.

Las técnicas para generar ácidos nucleicos serán evidentes para el experto y pueden incluir, por ejemplo, pero sin limitación, síntesis automatizada de ADN; mutagénesis dirigida al sitio; combinación de dos o más secuencias naturales y/o sintéticas (o dos o más partes de las mismas), introducción de mutaciones que dan lugar a la expresión de un producto de expresión truncado; introducción de uno o más sitios de restricción (por ejemplo, para crear casetes y/o regiones que puedan digerirse y/o ligarse fácilmente utilizando enzimas de restricción adecuadas) y/o introducción de mutaciones mediante una reacción de PCR utilizando uno o más cebadores "no coincidentes".

En una realización, dicha secuencia de nucleótidos o ácido nucleico está optimizada para su expresión en una célula hospedadora u organismo hospedador que es capaz de glicosilar el polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos o ácido nucleico.

En una realización adicional, dicha secuencia de nucleótidos o ácido nucleico está en forma de una construcción o vector (de expresión) que puede expresarse en una célula hospedadora u organismo hospedador que es capaz de glicosilar el polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos o ácido nucleico. Un vector, como se utiliza en el presente documento, es un vehículo adecuado para transportar

material genético a una célula. Un vector incluye ácidos nucleicos desnudos, tales como plásmidos o ARNm, o ácidos nucleicos embebidos en una estructura mayor, tales como liposomas o vectores víricos.

En algunas realizaciones, los vectores comprenden al menos un ácido nucleico que está opcionalmente unido a uno o más elementos reguladores, tales como por ejemplo uno o más promotores, potenciadores, terminadores adecuados, etc.). En una modalidad, el vector es un vector de expresión, es decir, un vector adecuado para expresar un polipéptido o construcción codificada en condiciones adecuadas, por ejemplo, cuando el vector se introduce en una célula (p. ej., humana). Los vectores basados en ADN incluyen la presencia de elementos para la transcripción (por ejemplo, un promotor y una señal de poliA) y la traducción (por ejemplo, secuencia de Kozak).

En una realización, en el vector, dicho al menos un ácido nucleico y dichos elementos reguladores están "unidos operativamente" entre sí, por lo que generalmente se entiende que están en una relación funcional entre sí. Por ejemplo, se considera que un promotor está "unido operativamente" a una secuencia codificante si dicho promotor es capaz de iniciar o controlar/regular de otro modo la transcripción y/o la expresión de una secuencia codificante (en cuyo caso debe entenderse que dicha secuencia codificante está "bajo el control de" dicho promotor). Generalmente, cuando dos secuencias de nucleótidos están unidas operativamente, estarán en la misma orientación y normalmente también en el mismo marco de lectura. Por lo general, también serán esencialmente contiguas, aunque esto también puede no ser necesario.

En una realización, cualquier elemento regulador del vector es tal que es capaz de proporcionar su función biológica prevista en la célula hospedadora u organismo hospedador previsto. Por ejemplo, un promotor, potenciador o terminador debe ser "operable" en la célula hospedadora u organismo hospedador previsto, lo que significa que, por ejemplo, dicho promotor debe ser capaz de iniciar o controlar/regular de otro modo la transcripción y/o la expresión de una secuencia de nucleótidos (p. ej., una secuencia codificante) a la que está unido operativamente.

En un aspecto adicional, la presente tecnología se refiere a un método para producir un polipéptido y/o glicoproteína de DVUI según la presente tecnología, en donde el método comprende la etapa de:

- expresar la secuencia de nucleótidos o ácido nucleico según la presente tecnología en una célula hospedadora (no humana) u organismo hospedador (no humano) adecuado, en donde la célula hospedadora u organismo hospedador es capaz de glicosilar el polipéptido expresado; opcionalmente seguido de
- aislar y/o purificar el polipéptido obtenido y/o glicoproteína de DVUI.

La célula hospedadora u organismo hospedador capaz de glicosilar el polipéptido expresado será normalmente una célula u organismo eucariota. En una realización, la célula hospedadora es una célula eucariota superior. Una "célula eucariota superior", como se utiliza en el presente documento, se refiere a células eucariotas que no son células de organismos unicelulares. En otras palabras, una célula eucariota superior es una célula de (o derivada de, en el caso de cultivos celulares) un eucariota multicelular tal como una línea celular humana u otra línea celular de mamífero (por ejemplo, una línea de células CHO). Normalmente, las células eucariotas superiores no serán células fúngicas. Particularmente, el término

generalmente se refiere a células de mamífero, líneas celulares humanas y líneas celulares de insecto. Más particularmente, el término se refiere a células de vertebrados, incluso más particularmente a células de mamífero o células humanas. Las células eucariotas superiores como se describen en el presente documento normalmente formarán parte de un cultivo celular (por ejemplo, una línea celular, tal como una

línea de células HEK o CHO), aunque esto no siempre es estrictamente necesario (por ejemplo, en el caso de células vegetales, la planta en sí puede usarse para producir una proteína recombinante).

En una realización, la célula hospedadora es una célula eucariota inferior. Por "célula eucariota inferior" se entiende una célula de hongo filamentoso o una célula de levadura. Las células de levadura pueden ser de las especies *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), *Hansenula* (por ejemplo, *Hansenula polymorpha*), *Arxula* (por ejemplo, *Arxula adenivorans*), *Yarrowia* (por ejemplo, *Yarrowia lipolytica*), *Kluyveromyces* (por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*), *Aspergillus niger* o *Komagataella phaffii* (Kurtzman, C.P. (2009) J Ind Microbiol Biotechnol. 36(11), que se nombró anteriormente y es mejor conocido bajo la antigua nomenclatura como *Pichia pastoris*, y cuyo nombre también se utilizará adicionalmente en el presente documento. De acuerdo con una realización específica, las células eucariotas inferiores son células de *Pichia* y, en una realización más particular, células de *Pichia pastoris*.

Algunos ejemplos no limitativos de líneas celulares de mamífero o cepas de levadura adecuadas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (HEK), células de mieloma de ratón Sp2/0 o Ns0 y células de riñón de hámster bebé (BHK), así como otras líneas celulares de mamífero y cepas de levadura que se pueden utilizar para la expresión/producción/fabricación de polipéptidos y proteínas que están destinados a la administración a sujetos humanos y/o para uso terapéutico.

La presente tecnología también se refiere a dichas células hospedadoras (no humanas) u organismos hospedadores (no humanos) que comprenden el polipéptido o la glicoproteína de DVUI de la presente tecnología, el ácido nucleico que codifica el polipéptido o la glicoproteína de DVUI de la presente tecnología, y/o el vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico.

6. Composición

En otro aspecto más, la presente tecnología se refiere a una composición que comprende un polipéptido según la presente tecnología; un polipéptido o una glicoproteína de DVUI producidos utilizando el método de la presente tecnología; un conjugado según la presente tecnología; un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente tecnología o un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico. La composición puede ser una composición farmacéutica. La composición puede comprender además al menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente comprender uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

7. Usos

El polipéptido, la glicoproteína de DVUI o conjugado de la presente tecnología, la molécula de ácido nucleico o el vector como se describe en el presente documento, o la composición que comprende el polipéptido, la glicoproteína de DVUI, el conjugado, la molécula de ácido nucleico o el vector de la presente tecnología son útiles como medicamento. En consecuencia, la presente tecnología proporciona el

polipéptido, la glicoproteína de DVUI o el conjugado de la presente tecnología, la molécula de ácido nucleico o el vector como se describe en el presente documento, o la composición que comprende el polipéptido, la glicoproteína de DVUI, el conjugado, la molécula de ácido nucleico o el vector de la presente tecnología para su uso como medicamento.

- 5 Como tal, se proporciona además un método para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad y/o trastorno, que comprende la administración, a un sujeto que lo necesite, de una cantidad farmacéuticamente activa de al menos un polipéptido, glicoproteína de DVUI o conjugado de la presente tecnología, la molécula de ácido nucleico o el vector como se describe en el presente documento, o una composición que comprende el polipéptido, la glicoproteína de DVUI, el conjugado, la
10 molécula de ácido nucleico o el vector de la presente tecnología.

8. Realizaciones

La invención se ejemplifica adicionalmente por, pero sin limitación a, las siguientes realizaciones.

- Realización 1. Polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un dominio variable único de inmunoglobulina (DVUI) de cadena pesada, en donde dicho DVUI comprende un sitio
15 aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

Realización 2. Polipéptido según la realización 1, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

- Realización 3. Polipéptido según la realización 1 o 2, en donde dicho sitio aceptor de
20 glicosilación está contenido en un motivo NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido, y en donde el residuo de asparagina del motivo NXT o NXS es el sitio aceptor de glicosilación.

Realización 4. Polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-3, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

- 25 Realización 5. Polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-3, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 19, 26, 55, 73, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

- Realización 6. Polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-3, en donde dicho sitio aceptor de glicosilación está presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones
30 de aminoácidos 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

Realización 7. Polipéptido según la realización 6, en donde dicho polipéptido es un polipéptido monovalente que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI.

- Realización 8. Polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en un DVUI, en donde dicho DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido
35 seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

Realización 9. Polipéptido de acuerdo con la realización 8, en donde el sitio aceptor de glicosilación está presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

5 Realización 10. Polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-3, en donde dicho polipéptido comprende al menos dos DVUI.

Realización 11. Polipéptido según la realización 10, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

10 Realización 12. Polipéptido según la realización 10, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

15 Realización 13. Polipéptido según la realización 10, en donde al menos uno de dichos al menos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 55, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

Realización 14. Polipéptido según la realización 10, en donde dicho polipéptido es un polipéptido bivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI.

20 Realización 15. Polipéptido según la realización 14, en donde el DVUI N-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

Realización 16. Polipéptido según la realización 14, en donde el DVUI C-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 19, 26, 55, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

25 Realización 17. Polipéptido según la realización 14, en donde al menos uno de los dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 55, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

30 Realización 18. Polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI, en donde al menos uno de dichos dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

Realización 19. Polipéptido según la realización 18, en donde al menos uno de los dos DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 55, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

35 Realización 20. Polipéptido según la realización 18, en donde el DVUI N-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

Realización 21. Polipéptido según la realización 18, en donde el DVUI C-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 19, 26, 55, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

5 Realización 22. Polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI, en donde el DVUI N-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

10 Realización 23. Polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en dos DVUI, en donde el DVUI C-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 19, 26, 55, 105 y 108, según la numeración de Kabat.

Realización 24. Polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-3, en donde dicho polipéptido comprende al menos tres DVUI.

15 Realización 25. Polipéptido según la realización 24, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

Realización 26. Polipéptido según la realización 24, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 15, 19, 26 y 105, según la numeración de Kabat.

20 Realización 27. Polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 24-26, en donde dicho polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

Realización 28. Polipéptido según la realización 24, 25 o 27, en donde el DVUI N-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 15, 19, 26, 55, 73, 75, 76, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

25 Realización 29. Polipéptido según la realización 24, 25 o 27, en donde el DVUI C-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26 y 105, según la numeración de Kabat.

30 Realización 30. Polipéptido según la realización 24, 25 o 27, en donde al menos uno de los al menos tres DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

35 Realización 31. Polipéptido que comprende o que consiste (esencialmente) en al menos tres DVUI, en donde al menos uno de dichos al menos tres DVUI comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

Realización 32. Polipéptido según la realización 31, en donde el DVUI N-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 15, 19, 26, 55, 73, 75, 76, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

Realización 33. Polipéptido según la realización 31, en donde el DVUI C-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 1, 3, 15, 19, 26 y 105, según la numeración de Kabat.

5 Realización 34. Polipéptido según la realización 31, en donde al menos uno de los al menos tres DVUI que no está ni en el extremo C-terminal ni en el extremo N-terminal comprende un sitio aceptor de glicosilación presente en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones de aminoácidos 3, 15, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 76, 102, 105, 108 y 110, según la numeración de Kabat.

Realización 35. Polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 31-34, en donde el polipéptido es un polipéptido trivalente que comprende o que consiste (esencialmente) en tres DVUI.

10 Realización 36. Polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-35 que está glicosilado en el sitio aceptor de glicosilación con uno o más glicanos.

Realización 37. Polipéptido según la realización 36, en donde el glicano se selecciona de una N-acetilglucosamina (GlcNAc) terminal, una manosa (terminal), un ácido siálico (terminal), una galactosa (terminal) o una combinación de los mismos.

15 Realización 38. El polipéptido según la realización 1, en donde la glicoproteína de DVUI es un polipéptido monovalente, en donde la secuencia del polipéptido se selecciona de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 73-78, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89-91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, y SEQ ID NO: 177-179.

20 Realización 39. El polipéptido según la realización 1, en donde la glicoproteína de DVUI es un polipéptido bivalente, en donde la secuencia del polipéptido se selecciona de SEQ ID NO: 99-102, SEQ ID NO: 105-108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 116-118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123-125, SEQ ID NO: 128-133, SEQ ID NO: 141-143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183 y SEQ ID NO: 187.

25 Realización 40. El polipéptido según la realización 1, en donde la glicoproteína de DVUI es un polipéptido trivalente, en donde la secuencia del polipéptido se selecciona de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22-24, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44-52, SEQ ID NO: 55-57, SEQ ID NO: 59-61, SEQ ID NO: 63-65, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 190 y SEQ ID NO: 191.

30 Realización 41. Secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que codifica un polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-40.

Realización 42. Secuencia de nucleótidos o ácido nucleico según la realización 41, que está optimizada para su expresión en una célula hospedadora u organismo hospedador que es capaz de glicosilar el polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos o ácido nucleico.

35 Realización 43. Secuencia de nucleótidos o ácido nucleico según la realización 41 o 42, que está en forma de una construcción o vector (de expresión) que puede expresarse en una célula hospedadora u organismo hospedador que es capaz de glicosilar el polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos o ácido nucleico.

Realización 44. Método para producir un polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-40, en donde el método comprende la etapa de:

- expresar la secuencia de nucleótidos o ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones 41-43 en una célula hospedadora u organismo hospedador adecuado,
5 en donde la célula hospedadora u organismo hospedador es capaz de glicosilar el polipéptido expresado.

Realización 45. Método para la conjugación de un resto con el polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-40, que comprende la etapa de:

- oxidar uno o más de los glicanos presentes en el polipéptido, opcionalmente utilizando
10 oxidación con peryodato; y
- conjugar el glicano oxidado con el resto.

Realización 46. Método según la realización 45, en donde el resto se selecciona de (bis-)manosa-6-fosfato, una PROTAC y un resto de PEG.

Realización 47. Conjugado que comprende el polipéptido según una cualquiera de las
15 realizaciones 1-40 y un resto conjugado, en donde el resto está conjugado con el glicano.

Realización 48. Conjugado según la realización 47, en donde el resto se selecciona de (bis-)manosa-6-fosfato, una PROTAC y un resto de PEG.

Realización 49. Composición que comprende un polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-40, un polipéptido producido utilizando el método de la realización 45 o 46, o un conjugado
20 según la realización 47 o 48.

Realización 50. El polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-40, la secuencia de nucleótidos o el ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones 41-43, el conjugado según la realización 47 o 48, o la composición según la realización 49 para su uso como medicamento.

Realización 51. Uso del polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-40, la secuencia
25 de nucleótidos o el ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones 41-43, el conjugado según la realización 47 o 48, o la composición según la realización 49 para su uso como medicamento.

30

35

A continuación, en la Tabla 2A y la Tabla 2B, se muestran listas de sitios aceptores de glicosilación preferidos presentes en los DVUI según la presente tecnología y el formato o formatos preferidos para dicho DVUI con el sitio aceptor de glicosilación.

Tabla 2A: Posiciones preferidas en el DVUI para sitios aceptores de glicosilación (numeración de Kabat)

5

10

15

20

Posición	Valencia
1	Monovalente, multivalente
3	Multivalente
15	Multivalente
19	Monovalente, multivalente
26	Monovalente, multivalente
53	Monovalente, multivalente
55	Monovalente, multivalente
68	Monovalente, multivalente
73	Monovalente, multivalente
75	Monovalente, multivalente
76	Multivalente
102	Monovalente, multivalente
105	Monovalente, multivalente
108	Monovalente, multivalente
110	Monovalente, multivalente

Tabla 2B: Posiciones preferidas adicionales en el DVUI para sitios aceptores de glicosilación (numeración de Kabat)

25

30

35

Posición	Valencia
1	Monovalente; multivalente, preferiblemente multivalente en DVUI C-terminal
3	Multivalente, preferiblemente bivalente, más preferiblemente trivalente
15	Multivalente, preferiblemente bivalente, más preferiblemente trivalente
19	Monovalente; multivalente
26	Monovalente; multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente
53	Monovalente; multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente en DVUI que no es DVUI C-terminal

5	55	Monovalente; multivalente, preferiblemente trivalente, más preferiblemente bivalente
	68	Monovalente; multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente en DVUI que no es DVUI C-terminal
	73	Monovalente; multivalente
	75	Monovalente; multivalente, preferiblemente en DVUI que no es DVUI C-terminal
10	76	Multivalente, preferiblemente trivalente
	102	Monovalente; multivalente, preferiblemente trivalente en DVUI que no es DVUI C-terminal
	105	Monovalente; multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente
15	108	Monovalente; multivalente, preferiblemente trivalente, más preferiblemente bivalente
	110	Multivalente, preferiblemente bivalente o trivalente en DVUI que no es DVUI C-terminal

La presente tecnología y sus realizaciones se describirán con más detalle en la sección de Ejemplos a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de construcciones de expresión de DVUI

Los fragmentos de ADN que codifican DVUI, obtenidos mediante PCR con combinaciones específicas de cebadores FR1 directos y FR4 inversos que llevan cada uno un sitio de restricción único, se digirieron con las enzimas de restricción apropiadas y se ligaron a los casetes de clonación correspondientes de vectores de expresión de DVUI. A continuación, las mezclas de ligación se utilizaron para transformar células electrocompetentes o químicamente competentes de *Escherichia coli* TG1 (Lucigen, n.º de cat. 60502 o fabricadas a medida, respectivamente) o TOP10 (ThermoFisher Scientific, n.º de cat. C404052 o C4081201, respectivamente), que se cultivaron bajo la presión de selección con antibióticos adecuada (kanamicina o zeocina). Los clones resistentes se verificaron mediante secuenciación de Sanger del ADN plásmido (LGC Genomics).

Preparación de construcciones para la expresión de DVUI monovalentes en E. coli

Los DVUI monovalentes se expresaron en células *E. coli* TG1 a partir de un vector de expresión plasmídico que contenía el promotor lac, un gen de resistencia a la kanamicina, un origen de replicación de *E. coli* y un sitio de clonación de DVUI precedido por la secuencia codificadora del péptido señal OmpA, que dirige los DVUI expresados al compartimento periplásmico del hospedador bacteriano. En el marco de la secuencia codificadora de DVUI, el vector codifica una etiqueta C-terminal 3xFLAG e His6.

Preparación de construcciones para la expresión de DVUI en células CHO

Los vectores de expresión de mamíferos usados para la expresión de las proteínas DVUI contenían el promotor RSV-LTR, un gen de resistencia para Zeocina y el péptido señal de una cadena ligera de ratón. El ADN que codifica los bloques de construcción de DVUI y enlazadores GS se clonó en el vector de expresión mediante clonación Golden Gate (Engler C, Marillonnet S. Golden Gate cloning. Methods Mol Biol. 2014; 1116:119-31). Los vectores de expresión contenían dos sitios de restricción Bpil para la clonación del ADN de DVUI monovalentes amplificados por PCR junto con el ADN de enlazadores GS en uno o varios vectores. Todos estos elementos estaban flanqueados por sitios Bpil. El uso de salientes de nucleótidos únicos para cada posición del casete de clonación permitió un ligamiento sin fisuras en un orden predefinido. Después de la confirmación de la secuencia de Sanger, el ADN plasmídico derivado de *E. coli* TOP10 se transfectó en células CHOEBNALT85.

Ejemplo 2: Expresión de DVUI en *E. coli*

Las células *E. coli*, que contenían el vector de expresión de DVUI, se cultivaron durante 2 horas a 37 °C seguido de 29 horas a 30 °C (250 rpm) en un matraz agitador con deflectores que contenía un medio de autoinducción "5052" (50x de solución madre: 25 % de glicerol, 2.5 % de glucosa, 10 % de lactosa). Las células se granularon mediante centrifugación (20 minutos, 4500 rpm, 4 °C), el sobrenadante se desechó y los gránulos se congelaron durante la noche a -20 °C. Los gránulos celulares congelados se disolvieron después en DPBS (Gibco, n.º de cat. 14190-094) a 1/12.5 del volumen de cultivo original y se incubaron a 4 °C durante 1 hora con rotación suave, para romper la membrana externa de las células. Las células se granularon de nuevo (20 minutos, 8500 rpm, 4 °C) y el sobrenadante, que contenía los DVUI, se recogió y filtró para proceder inmediatamente a la purificación.

Los DVUI expresados en *E. coli* se consideraron controles ya que no se producirá glicosilación en la expresión a través de *E. coli*.

Ejemplo 3: Expresión de DVUI en células de mamífero

Las células CHOEBNALT85-1E9 (tecnología QMCF con licencia de Icosagen) se sembraron a una densidad de 1.5E06 células/ml en 10 ml de medio CHO TF (Xell, n.º de cat. 8860001) con suplemento GlutaMAX™ (Gibco, n.º de cat. 35050-038) y se transfectaron con un complejo de ADN/reactivo de transfección 007. El complejo se formó mezclando 10 µg de ADN plasmídico en 300 µl de agua y 50 µg de reactivo de transfección 007 (Icosagen, n.º de cat. R007P001) en 200 µl de agua e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación durante 1.5 horas a 37 °C, se añadieron 10 ml de medio CHO TF reciente con suplemento de GlutaMAX™, y se permitió que las células crecieran durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 10 ml de medio CHO TF fresco con suplemento de GlutaMAX™ y penicilina-estreptomicina (Gibco, n.º de cat. 15140-122), y las células se incubaron durante otras 72 horas a 37 °C. Luego, se determinó la densidad celular y al alcanzar 3.5E06 células/ml con una viabilidad de > 90 %, se añadieron 1.8 ml de Basic Feed (Xell, n.º de cat. 1092-0001) a las células y la temperatura de incubación se redujo hasta 30 °C. Se añadió Basic Feed de nuevo después de 48 horas y una vez más después de otras 48 horas. Después de una incubación final de 72 horas, las células se granularon mediante centrifugación (10 minutos a 1000 rpm), después de lo cual el sobrenadante se transfirió a otro tubo. El sobrenadante se centrifugó de nuevo para eliminar los restos celulares restantes.

(30 minutos a 8500 rpm) y el medio que contenía los DVUI se recogió, se filtró y se almacenó a -20 °C hasta su purificación. Todas las incubaciones se realizaron en una incubadora de agitador orbital humidificada a 200 rpm en presencia de CO₂ al 8 %.

Ejemplo 4: Purificación de DVUI utilizando cromatografía de afinidad con proteína A

5 Las construcciones de DVUI se purificaron en proteína A seguida de una etapa de desalinización y, en caso necesario, SEC preparativa en D-PBS. La concentración se determinó mediante la medición OD280/OD340. El control de calidad se realizó mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas.

La lista completa de DVUI generados puede encontrarse en la Tabla 3 mostrada en el presente documento a continuación en el Ejemplo 5.

10 Ejemplo 5: Análisis de glicosilación

Las glicoproteínas de DVUI obtenidas de las células de mamífero se analizaron mediante SDS page para determinar su glicosilación en los diferentes sitios aceptores de glicosilación. Los oligosacáridos ligados a N se eliminaron mediante PNGasa para confirmar que el cambio en el peso molecular (MW) en SDS-PAGE se debe de hecho a la glicosilación. Más específicamente, si el cambio en MW no desaparece 15 tras el tratamiento con PNGasa, en comparación con el control no glucosilado de tipo natural, significa que algo distinto de un azúcar añadido provocó el aumento en MW.

Etapas F de la PNGasa

Los oligosacáridos ligados a N se eliminaron de las glicoproteínas de DVUI mediante PNGasa F (N-glucosidasa F). El método se realizó según las instrucciones del fabricante (NEB, n.º de catálogo 20 P0704S): se añadieron 5-10 µg de DVUI glicosilado, 1 µl de tampón desnaturante de glicoproteína 10x y H₂O a un volumen total de 10 µl. La mezcla se calentó durante 10 minutos a 100 °C antes de enfriar en hielo y una centrifugación corta a 10 segundos. Posteriormente, se añadieron 2 µl de Glicotampón 10x, 2 µl de NP-40 al 10 % y 6 µl de H₂O antes de la adición de 1 µl de PNGasa F. La reacción se mezcló suavemente y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, se analizaron 2 µg de la mezcla utilizando 25 análisis SDS-PAGE, según el protocolo descrito en el presente documento a continuación.

Protocolo de análisis de SDS-PAGE

La muestra de 2 µg se analizó en un gel BT NUPAGE SDS PAGE prefabricado al 4-12 % (Invitrogen, n.º NP0321BOX o NP0323BOX), tanto en condiciones reductoras (R), calentadas como no reductoras (NR), no calentadas. El tampón de carga fue NuPAGE, tampón de muestra 4x LDS (Invitrogen, n.º NR0008). El 30 calentamiento se produjo a 98 °C durante 3 min. Se cargaron 5 µl de marcador (patrón de proteína preteñido Sharp, Novex, n.º LC5800) antes de que el gel se ejecutara en 1x tampón de funcionamiento MES, a un voltaje de 180 V durante 40 min. Finalmente, el gel se tiñó con Instant Blue y se destiñó con agua del grifo durante 8 h.

Análisis de espectrometría de masas

35 Los análisis de LC-MS de masa intacta se realizaron en una UHPLC de la serie 1290 de Agilent acoplada a un espectrómetro de masas Agilent Q-TOF 6530 (ambos de Agilent Technologies), o en una UHPLC Vanquish Flex acoplada a un espectrómetro de masas Q-Exactive Plus (ambos de Thermo Fisher Scientific). Después de la desalación en línea utilizando una columna de microdesalación MassPREP

(Waters), la masa molecular del (de los) producto(s) principal(es) se determinó después de la desconvolución del estado de carga de los datos de MS sin procesar.

Resultados

Solo se consideró que los DVUI que tenían un grado de glicosilación superior al 50 % estaban suficientemente glicosilados. La lista completa de los DVUI sometidos a prueba se puede encontrar a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3: Análisis de glicosilación de DVUI generados

ID del DVUI	SEQ ID NO	Sitio(s) aceptador(es) de glicosilación	Valencia/mutación de ubicación	Grado de glicosilación
ALB00606	1	15N	Mono	N/A
ALB00607	2	19N	Mono	N/A
ALB00608	3	26N	Mono	N/A
ALB00609	4	55N	Mono	N/A
ALB00610	5	105N	Mono	N/A
ALB00611	6	108N	Mono	N/A
ALB00612	7	75T*	Mono	N/A
ALB00613	8	15N	Mono	20 %
ALB00614	9	19N	Mono	50 %
ALB00615	10	26N	Mono	60 %
ALB00616	11	55N	Mono	100 %
ALB00617	12	105N	Mono	40 %
ALB00618	13	108N	Mono	20 %
ALB00619	14	75T*	Mono	100 %
ALB00620	15	3N, 5T**	Mono	5 %
ALB00621	16	3N, 5T**	Mono	N/A
ALB00622	17	NINGUNO	Mono	N/A
ALB00623	18	NINGUNO	Mono	0 %
T043800001	19	NINGUNO	Tri	0 %
T043800002	20	3N, 5T**	Tri / C-terminal	100 %
T043800003	21	5N	Tri / C-terminal	10 %
T043800004	22	15N	Tri / C-terminal	80 %
T043800005	23	19N	Tri / C-terminal	95 %
T043800006	24	26N	Tri / C-terminal	99 %
T043800007	25	53N	Tri / C-terminal	10 %
T043800008	26	55N	Tri / C-terminal	50 %

5	T043800009	27	68N	Tri / C-terminal	0 %
	T043800010	28	A74N, T76**	Tri / C-terminal	10 %
	T043800011	29	102N	Tri / C-terminal	5 %
	T043800012	30	105N	Tri / C-terminal	70 %
	T043800013	31	108N	Tri / C-terminal	50 %
10	T043800014	32	110N	Tri / C-terminal	0 %
	T043800015	33	75N	Tri / C-terminal	10 %
	T043800016	34	75T*	Tri / C-terminal	50 %
	T043800055	35	NINGUNO	Tri	0 %
	T043800056	36	15N	Tri / N-terminal	60 %
15	T043800057	37	19N	Tri / N-terminal	100 %
	T043800058	38	26N	Tri / N-terminal	100 %
	T043800059	39	53N	Tri / N-terminal	nd
	T043800060	40	55N	Tri / N-terminal	100 %
	T043800061	41	68N	Tri / N-terminal	nd
20	T043800062	42	74N	Tri / N-terminal	60 %
	T043800063	43	102N	Tri / N-terminal	nd
	T043800064	44	105N	Tri / N-terminal	100 %
	T043800065	45	75N	Tri / N-terminal	100 %
	T043800066	46	76N	Tri / N-terminal	100 %
25	T043800067	47	15N	Tri / medio	90 %
	T043800068	48	19N	Tri / medio	100 %
	T043800069	49	26N	Tri / medio	100 %
	T043800070	50	53N	Tri / medio	90 %
	T043800071	51	55N	Tri / medio	100 %
30	T043800072	52	68N	Tri / medio	100 %
	T043800073	53	74N	Tri / medio	50 %
	T043800074	54	102N	Tri / medio	90 %
	T043800075	55	105N	Tri / medio	100 %
	T043800076	56	75N	Tri / medio	100 %
35	T043800089	57	3N, 5T**	Tri / N-terminal	90 %
	T043800090	58	5N	Tri / N-terminal	nd
	T043800091	59	3N, 5T**	Tri / medio	100 %
	T043800092	60	108N	Tri / N-terminal	100 %
	T043800093	61	110N	Tri / N-terminal	100 %
	T043800094	62	5N	Tri / medio	0 %

5	T043800095	63	108N	Tri / medio	100 %
	T043800096	64	110N	Tri / medio	100 %
	T043800097	65	76N	Tri / medio	100 %
	T043800098	66	NINGUNO	Tri	0 %
	T043800118	67	3N, 5T**	Mono	20 %
10	T043800119	68	110N	Mono	50 %
	T043800120	69	75N	Mono	100 %
	T043800121	70	75T*	Mono	100 %
	T043800122	71	5N	Mono	0 %
	T043800123	72	15N	Mono	10 %
15	T043800124	73	19N	Mono	100 %
	T043800125	74	26N	Mono	90 %
	T043800126	75	55N	Mono	100 %
	T043800127	76	68N	Mono	90 %
	T043800128	77	105N	Mono	90 %
20	T043800129	78	108N	Mono	90 %
	T043800130	79	NINGUNO	Mono	0 %
	T043800131	80	5N	Mono	5 %
	T043800133	81	55N	Mono	90 %
	T043800134	82	68N	Mono	40 %
25	T043800135	83	108N	Mono	90 %
	T043800136	84	110N	Mono	30 %
	T043800137	85	75T*	Mono	95 %
	T043800138	86	NINGUNO	Mono	0 %
	T043800139	87	110N	Mono	80 %
30	T043800143	88	15N	Mono	20 %
	T043800144	89	19N	Mono	80 %
	T043800145	90	26N	Mono	90 %
	T043800146	91	55N	Mono	80 %
	T043800147	92	68N	Mono	30 %
35	T043800148	93	105N	Mono	90 %
	T043800149	94	108N	Mono	90 %
	T043800150	95	NINGUNO	Mono	0 %
	T043800159	96	1N, 3S**	Mono	100 %
	T043800161	97	3N, 5T**	Mono	10 %
	T043800178	98	NINGUNO	Bi/N-terminal	0 %

5	T043800179	99	3N, 5T**	Bi/N-terminal	90 %
	T043800180	100	110N	Bi/N-terminal	99 %
	T043800181	101	75N	Bi/N-terminal	99 %
	T043800182	102	75T*	Bi/N-terminal	99 %
	T043800183	103	5N	Bi/N-terminal	0 %
10	T043800184	104	15N	Bi/N-terminal	40 %
	T043800185	105	19N	Bi/N-terminal	100 %
	T043800186	106	26N	Bi/N-terminal	99 %
	T043800187	107	55N	Bi/N-terminal	99 %
	T043800188	108	108N	Bi/N-terminal	100 %
15	T043800189	109	NINGUNO	Bi/C-terminal	0 %
	T043800190	110	3N, 5T**	Bi/C-terminal	99 %
	T043800191	111	110N	Bi/C-terminal	0 %
	T043800192	112	75N	Bi/C-terminal	30 %
	T043800193	113	75T*	Bi/C-terminal	50 %
20	T043800194	114	5N	Bi/C-terminal	0 %
	T043800195	115	15N	Bi/C-terminal	30 %
	T043800196	116	19N	Bi/C-terminal	100 %
	T043800197	117	26N	Bi/C-terminal	99 %
	T043800198	118	55N	Bi/C-terminal	90 %
25	T043800199	119	68N	Bi/C-terminal	10 %
	T043800200	120	105N	Bi/C-terminal	90 %
	T043800201	121	108N	Bi/C-terminal	90 %
	T043800202	122	NINGUNO	Bi/N-terminal	0 %
	T043800203	123	110N	Bi/N-terminal	99 %
30	T043800204	124	75N	Bi/N-terminal	100 %
	T043800205	125	73N	Bi/N-terminal	100 %
	T043800206	126	5N	Bi/N-terminal	0 %
	T043800207	127	15N	Bi/N-terminal	50 %
	T043800208	128	19N	Bi/N-terminal	99 %
35	T043800209	129	26N	Bi/N-terminal	100 %
	T043800210	130	55N	Bi/N-terminal	100 %
	T043800211	131	68N	Bi/N-terminal	100 %
	T043800212	132	105N	Bi/N-terminal	100 %
	T043800213	133	108N	Bi/N-terminal	100 %
	T043800214	134	3N, 5T**	Bi/N-terminal	60 %

5	T043800215	135	NINGUNO	Bi/C-terminal	0 %
	T043800216	136	110N	Bi/C-terminal	0 %
	T043800217	137	75N	Bi/C-terminal	40 %
	T043800218	138	73N	Bi/C-terminal	60 %
	T043800219	139	5N	Bi/C-terminal	0 %
10	T043800220	140	15N	Bi/C-terminal	50 %
	T043800221	141	19N	Bi/C-terminal	90 %
	T043800222	142	26N	Bi/C-terminal	100 %
	T043800223	143	55N	Bi/C-terminal	80 %
	T043800224	144	68N	Bi/C-terminal	30 %
15	T043800225	145	105N	Bi/C-terminal	90 %
	T043800226	146	108N	Bi/C-terminal	80 %
	T043800227	147	3N, 5T**	Bi/C-terminal	50 %
	T043800228	148	68N	Bi/N-terminal	95 %
	T043800229	149	105N	Bi/N-terminal	100 %
20	T043800899	177	53N	Mono	100 %
	T043800901	178	53N	Mono	95 %
	T043800902	179	102N	Mono	100 %
	T043800969	180	1N	Bi/N-terminal	10 %
	T043800970	181	1N	Bi/N-terminal	10 %
25	T043800971	182	1N	Bi/C-terminal	95 %
	T043800972	183	1N	Bi/C-terminal	90 %
	T043800973	184	1N	Tri/N-terminal	10 %
	T043800974	185	1N	Tri/medio	0 %
	T043800975	186	1N	Tri/C-terminal	100 %
30	T043800976	187	53N	Bi/N-terminal	95 %
	T043800977	188	53N	Bi/C-terminal	5 %
	T043800978	189	53N	Tri/N-terminal	nd
	T043800979	190	73N	Tri/N-terminal	90 %
	T043800980	191	73N	Tri/medio	100 %
35	T043800981	192	102N	Bi/N-terminal	0 %
	T043800982	193	102N	Bi/C-terminal	0 %
	T043800983	194	102N	Tri/N-terminal	nd
	T043800984	195	102N	Tri/medio	nd
	T043800985	196	102N	Tri/C-terminal	0 %
Notas:					

N/A significa "no aplicable"

nd significa "no determinado"

*= el sitio aceptor de glicosilación real está en posición 73, pero la mutación estaba en posición 75

**= se mutó el motivo NXS-/NXT completo; el sitio aceptor de glicosilación real es el Asn.

5

Sorprendentemente, los inventores encontraron que algunos sitios aceptores de glicosilación solo se glicosilaron en algunos formatos de DVUI y/o en ciertas configuraciones específicas de los DVUI, mientras que otros sitios aceptores de glicosilación tenían diferentes requisitos para obtener altos grados de glicosilación.

10 Basándose en el análisis de glicosilación realizado, se concluyó que las siguientes posiciones en el DVUI para su uso como sitios aceptores de glicosilación (numeración de Kabat) tenían un buen grado de glicosilación cuando el DVUI estaba en un formato monovalente, así como en un formato multivalente: 1, 19, 26, 53, 55, 68, 73, 75, 102, 105, 108 y 110. Sorprendentemente, sin embargo, el uso de un sitio aceptor de glicosilación presente en una de las posiciones 53, 68, 75, 102 y 110 en el DVUI C-terminal de
15 un formato multivalente dio como resultado un bajo grado de glicosilación, mientras que, el uso de sitios aceptores de glicosilación en estas posiciones cuando no estaba presente en el DVUI C-terminal de un formato multivalente, dio como resultado altos grados de glicosilación. Para la posición 102, esto estaba específicamente en un formato trivalente, o superior.

20 De manera opuesta, para la posición 1 se observó que en un formato multivalente, se observaron altos grados de glicosilación solo si el sitio aceptor de glicosilación estaba presente en el DVUI C-terminal.

Para los sitios aceptores de glicosilación en las posiciones 3 y 15 del DVUI, se observó que solo se podían obtener altos grados de glicosilación cuando el DVUI estaba en un formato multivalente. Para el sitio aceptor de glicosilación en la posición 15 del DVUI específicamente, se observó que solo se podían obtener altos grados de glicosilación cuando el DVUI estaba en el formato trivalente, o superior. La posición
25 76 solo se probó en un formato trivalente y produjo altos grados de glicosilación en este formato.

Ejemplo 6: Ensayo de desplazamiento térmico

En este ensayo se determinó si la glicosilación de DVUI tenía un efecto sobre la temperatura de fusión. Se utilizaron los siguientes DVUI: ALB00606 (SEQ ID NO: 1), ALB00607 (SEQ ID NO: 2), ALB00608 (SEQ ID NO: 3), ALB00609 (SEQ ID NO: 4), ALB00610 (SEQ ID NO: 5), ALB00611 (SEQ ID NO: 6),
30 ALB00612 (SEQ ID NO: 7), ALB00616 (SEQ ID NO: 11), ALB00621 (SEQ ID NO: 16), ALB00622 (SEQ ID NO: 17).

De estos ALB00606, ALB00607, ALB00608, ALB00609, ALB00610, ALB00611, ALB00612, ALB00621 y ALB00622 se produjeron en *E. coli* (en la que no se produce glicosilación) y se sirvieron como controles.

35 ALB00616 se produjo en células CHO, por lo tanto, se produciría glicosilación, y sirvió como DVUI glicosilado ilustrativo. Dado que la secuencia de ALB00616 es idéntica a la secuencia de ALB00609, la única diferencia entre estos DVUI producidos de manera diferente es si están glicosilados o no.

El ensayo de desplazamiento térmico (TSA) se realizó en una placa de 96 pocillos en una máquina de qPCR (LightCycler 480II, Roche). Por fila, se analizó un DVUI en el siguiente intervalo de pH: 4, 5, 6, 7, 8 y 9. En algunos casos, también se incluyeron seis tampones de formulación diferentes, a saber, acetato 20 mM (pH 5), histidina 20 mM (pH 6) o fosfato 20 mM (pH 7), ya sea con o sin sacarosa al 8 %. Por pocillo, se añadieron 5 µl de muestra de DVUI (0.8 mg/ml en D-PBS) a 5 µL de Sypro Orange (40× en agua MilliQ; Invitrogen, n.º de cat. n.º S6551) y 10 µl de tampón (fosfato 100 mM, borato 100 mM, citrato 100 mM y NaCl 115 mM con un pH que varía de 4 a 9). Se aplicó un gradiente de temperatura (de 37 a 99 °C a una velocidad de 0.03 °C/s), lo que indujo el despliegue de los DVUI y, por tanto, la exposición de los parches hidrófobos. La unión de Sypro Orange a estos parches hidrófobos provocó un aumento de la intensidad de fluorescencia, que se midió (Ex/Em = 465/580 nm). El punto de inflexión de la primera derivada de la curva de intensidad de fluorescencia a pH 7 sirvió como medida de la temperatura de fusión (T_m).

Resultados

Los resultados del ensayo térmico se muestran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4: Temperaturas de fusión medidas de los DVUI cuando se produjeron en células de

***E. coli* o CHO**

ID del DVUI	SEQ ID NO	Temperatura de fusión (°C)
ALB00606	1	71
ALB00607	2	72
ALB00608	3	71
ALB00609	4	74
ALB00610	5	74
ALB00611	6	72
ALB00612	7	74
ALB00616	11	74
ALB00621	16	72
ALB00622	17	74

Como se puede ver en la Tabla 4, la temperatura de fusión fue la misma para los DVUI no glicosilados y los glicosilados. En particular, los DVUI con una secuencia idéntica ALB00609 (DVUI de control producido en *E. coli*) y ALB00616 (DVUI ilustrativo producido en células CHO) no mostraron ninguna diferencia en la temperatura de fusión tanto si estaba glicosilado como si no.

En consecuencia, se puede concluir que las temperaturas de fusión de los DVUI glicosilados no se ven afectadas por la glicosilación de dichos DVUI.

Ejemplo 7: Análisis de afinidad de la interacción DVUI/albúmina sérica humana utilizando resonancia de plasmones superficiales

La afinidad de los DVUI por la albúmina sérica humana (HSA) se determinó mediante resonancia plasmónica superficial (SPR). Se sometieron a prueba T043800002 (SEQ ID NO: 20), T043800003 (SEQ ID NO: 21), T043800004 (SEQ ID NO: 22), T043800005 (SEQ ID NO: 23), T043800008 (SEQ ID NO: 26)

y T043800012 (SEQ ID NO: 30). Se utilizó como referencia el DVUI de tipo natural T04380001 (SEQ ID NO: 19).

HSA (Sigma-Aldrich, n.º de Cat. A8763000) se inmovilizó directamente en la célula de flujo 2 (Fc) de un chip Biacore C1 en un instrumento Biacore 8K(+): La activación del chip se realizó mediante una inyección de 7 min de EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, 200 mM, Sigma Aldrich n.º de Cat 39391)/NHS (N-hidroxisuccinimida, 50 mM, Sigma Aldrich n.º de Cat 130672), HSA se diluyó hasta 4 µg/ml en tampón de acetato 10 mM, pH 4.5 y fluyó sobre los canales 1 a 8 de FC1 para la inmovilización, antes de una etapa de desactivación con HCl (1M, Cytiva) durante 7 min. La velocidad de flujo durante la activación, inmovilización y desactivación se fijó en 10 µl/min. Se estableció una determinación de afinidad con una serie de dilución de 6 puntos que oscilaba entre 1000 y 1 nM de DVUI. Las diversas concentraciones se probaron en un modo cinético de ciclo múltiple con un caudal de 30 µl/min, tiempo de asociación de 120 s y tiempo de disociación de 600 s en tampón HBS-EP+ 1x. Las condiciones de regeneración después de cada análisis de interacción se realizaron haciendo fluir el tampón de glicina 10 mM pH 1.5 durante 60 s a un caudal de 30 µl/min sobre la superficie del chip. El análisis de los datos se realizó usando el software de evaluación Biacore Insight.

Resultados

Los resultados de las mediciones de afinidad de los DVUI sometidos a prueba se puede encontrar a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5: determinación de afinidad de DVUI por HSA (SPR)

ID del DVUI	SEQ ID NO	Valencia/ mutación en que DVUI	K _D (M)
T04380001 (tipo natural)	19	Tri / C-terminal	8.40E-09
T043800002	20	Tri / C-terminal	1.50E-08
T043800004	22	Tri / C-terminal	1.10E-08
T043800005	23	Tri / C-terminal	1.30E-08
T043800008	26	Tri / C-terminal	1.30E-08
T043800012	30	Tri / C-terminal	1.50E-08

Como puede verse en la tabla 5, la afinidad de los DVUI glicosilados frente al DVUI de referencia de tipo natural es comparable. Esto demuestra que los DVUI glicosilados mantienen su alta afinidad por su diana.

Ejemplo 8: Análisis de afinidad de la interacción DVUI/EGFR utilizando resonancia de plasmones superficiales

La afinidad de los DVUI por EGFR se determinó mediante resonancia plasmónica superficial (SPR). Se sometieron a prueba los DVUI T043800179 (SEQ ID NO: 99), T043800180 (SEQ ID NO: 100), T043800181 (SEQ ID NO: 101), T043800182 (SEQ ID NO: 102), T043800185 (SEQ ID NO: 105), T043800187 ((SEQ ID NO: 107), T043800190 (SEQ ID NO: 110), T043800196 (SEQ ID NO: 116),

T043800198 (SEQ ID NO: 118) y T043800200 (SEQ ID NO: 120). Los DVUI de tipo natural T043800178 (SEQ ID NO: 98) y T043800189 (SEQ ID NO: 109) se tomaron como referencias.

EGFR (Sino Biological, n.º de Cat. LC14JA1103) se inmovilizó directamente en la célula de flujo 2 (Fc) de un chip CM5 Biacore en un instrumento Biacore 8K(+): La activación del chip se realizó mediante una inyección de 7 min de EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, 200 mM, Sigma Aldrich n.º de Cat 39391)/NHS (N-hidroxisuccinimida, 50 mM, Sigma Aldrich n.º de Cat 130672), EGFR se diluyó hasta 4 µg/ml en tampón de acetato 10 mM, pH 4.5 y fluyó sobre los canales 1 a 8 de FC1 para la inmovilización, antes de una etapa de desactivación con HCl (1M, Cytiva) durante 7 min. La velocidad de flujo durante la activación, inmovilización y desactivación se fijó en 10 µl/min. Se estableció una determinación de afinidad con una serie de dilución de 6 puntos que oscilaba entre 2500 y 0.06 nM de DVUI. Las diversas concentraciones se probaron en un modo cinético de ciclo múltiple con un caudal de 30 µl/min, tiempo de asociación de 120 s y tiempo de disociación de 600 s en tampón HBS-EP+ 1x. Las condiciones de regeneración después de cada análisis de interacción se realizaron haciendo fluir 2 veces el tampón de glicina 10 mM pH 2.5 durante 30 s a un caudal de 45 µl/min sobre la superficie del chip. El análisis de los datos se realizó usando el software de evaluación Biacore Insight.

Resultados

Los resultados de los análisis de afinidad pueden encontrarse a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6: determinación de afinidad de DVUI por EGFR (SPR)

ID del DVUI	SEQ ID NO	Valencia/ mutación en que DVUI	K _D (M)
T043800178 (tipo natural)	98	Bi/N-terminal	2.30E-06
T043800179	99	Bi/N-terminal	3.40E-06
T043800180	100	Bi/N-terminal	2.20E-06
T043800181	101	Bi/N-terminal	3.20E-06
T043800182	102	Bi/N-terminal	6.00E-06
T043800185	105	Bi/N-terminal	2.50E-06
T043800187	107	Bi/N-terminal	3.60E-06
T043800189 (tipo natural)	109	Bi/C-terminal	7.50E-06
T043800190	110	Bi/C-terminal	6.40E-05
T043800196	116	Bi/C-terminal	9.30E-06
T043800198	118	Bi/C-terminal	9.00E-06
T043800200	120	Bi/C-terminal	3.20E-05

Como se puede observar en la Tabla 6, la afinidad de los DVUI glicosilados frente a los DVUI de referencia de tipo natural disminuyó en un máximo de 4 veces, manteniendo todos los DVUI una alta afinidad. Esto demuestra que los DVUI glicosilados mantienen su alta afinidad por su diana.

Ejemplo 9: Análisis de afinidad de la interacción DVUI/albúmina sérica humana utilizando Meso Scale Discovery

La afinidad de los DVUI por HSA se determinó adicionalmente por Meso Scale Discovery (MSD). Se sometieron a prueba los DVUI T043800056 (SEQ ID NO: 36), T043800057 (SEQ ID NO: 37), T043800060 (SEQ ID NO: 40), T043800064 (SEQ ID NO: 44), T043800065 (SEQ ID NO: 45), T043800066 (SEQ ID NO: 46), T043800067 (SEQ ID NO: 47), T043800068 (SEQ ID NO: 48), T043800070 (SEQ ID NO: 50), T043800071 (SEQ ID NO: 51), T043800072 (SEQ ID NO: 52), T043800074 (SEQ ID NO: 54), T043800075 (SEQ ID NO: 55), T043800076 (SEQ ID NO: 56), T043800089 (SEQ ID NO: 57), T043800093 (SEQ ID NO: 61) y T043800096 (SEQ ID NO: 64). Los DVUI de tipo natural T043800055 (SEQ ID NO: 35) y T043800098 (SEQ ID NO: 66) se tomaron como referencias.

La albúmina sérica humana (HSA, Sigma-Aldrich, n.º de Cat. A8763000) se biotiniló usando NHS-LC-biotina (ThermoFisher, n.º de Cat. 21336) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con un grado promedio de etiquetado de 1. La HSA biotinilada se capturó a una concentración de 1 µg/ml en una placa SECTOR de estreptavidina de punto pequeño de MSD GOLD de 96 pocillos (MSD, n.º de Cat. L45SA-1). Posteriormente, se añadieron a la placa 25 µl de mezclas preequilibradas (2 horas a temperatura ambiente) que contenían una concentración fija de 100 pM del compuesto DVUI a probar con HSA que variaba de 1.13 pM a 10 µM, respectivamente (23 diluciones, factor de dilución de 1/3). La placa se dejó incubar durante 10 minutos para capturar el compuesto DVUI libre antes de lavar con PBS 3x 150 µl + Tween-20 al 0.05 %. Durante la etapa de detección final, se añadieron 25 µl de un anticuerpo anti-DVUI marcado con Sulfo a una concentración de 2 µg/ml y se dejó incubar durante 1 hora, seguido de un lavado final de 150 µl con 1x PBS + Tween-20 al 0.05 %. Tras añadir 150 µl de tampón de lectura MSD (Meso Scale Diagnostics, n.º de cat. R92TG-1), la placa se leyó en un lector MSD QuickPlex SQ120. Los datos se analizaron utilizando un ajuste logístico de cuatro parámetros (4PL) en GraphPad Prism 8.

Resultados

Los resultados de los análisis de afinidad pueden encontrarse a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7: determinación de afinidad de DVUI por HSA (MSD)

ID del DVUI	SEQ ID NO	Valencia/ mutación en que DVUI	K _D (M)
T043800055 (tipo natural)	35	Tri / N-terminal	3.10E-09
T043800056	36	Tri / N-terminal	1.60E-09
T043800057	37	Tri / N-terminal	2.00E-09
T043800060	40	Tri / N-terminal	2.30E-09
T043800064	44	Tri / N-terminal	4.30E-10
T043800065	45	Tri / N-terminal	5.90E-10
T043800066	46	Tri / N-terminal	1.60E-09
T043800067	47	Tri / medio	5.7E-09
T043800068	48	Tri / medio	4.2E-09
T043800070	50	Tri / medio	4.7E-09
T043800071	51	Tri / medio	4.9E-09
T043800072	52	Tri / medio	4.2E-09
T043800074	54	Tri / medio	5.8E-09
T043800075	55	Tri / medio	5.4E-09
T043800076	56	Tri / medio	2.9E-09
T043800089	57	Tri / N-terminal	8.8E-10
T043800093	61	Tri / N-terminal	4.5E-10
T043800096	64	Tri / medio	5.10E-09
T043800098 (tipo natural)	66	Tri / medio	2.1E-09

Como puede verse en la tabla 7, la afinidad de los DVUI glicosilados frente a los DVUI de referencia de tipo natural es comparable. Esto demuestra que los DVUI glicosilados mantienen su alta afinidad por su diana.

Ejemplo 10: Análisis de afinidad de la interacción DVUI/TNF α utilizando Meso Scale Discovery

La afinidad de los DVUI por TNF α se determinó adicionalmente por Meso Scale Discovery (MSD). Se sometieron a prueba T043800002 (SEQ ID NO: 20), T043800003 (SEQ ID NO: 21), T043800004 (SEQ ID NO: 22), T043800005 (SEQ ID NO: 23), T043800008 (SEQ ID NO: 26), T043800012 (SEQ ID NO: 30) y T043800016 (SEQ ID NO: 34). Se utilizó como referencia el DVUI de tipo natural T043800001 (SEQ ID NO: 19).

El TNF α humano (Bio-technie, n.º de Cat 210-TA) se biotiniló usando NHS-LC-Biotina (ThermoFisher, n.º de Cat 21336) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con un grado promedio de etiquetado de 1. El TNF α biotinilado se capturó a una concentración de 0.5 μ g/ml en una placa SECTOR de estreptavidina de punto pequeño MSD GOLD de 96 pocillos (MSD, n.º de Cat. L45SA-1). Posteriormente, se añadió a la placa 25 μ l de mezclas preequilibradas (24 horas a temperatura ambiente) que contenían una concentración fija de 12.8 pM del compuesto DVUI a probar con TNF α que variaba de 78 fM a 10 μ M, respectivamente (23 diluciones, factor de dilución de 1/10 de 1 a 0.01 μ M; factor de dilución de 1/1.8 de 10

nM a 78 fM). La placa se dejó incubar durante 10 minutos para capturar el compuesto DVUI libre antes de lavar con PBS 3x 150 µl + Tween-20 al 0.05 %. Durante la etapa de detección final, se añadieron 25 µl de un anticuerpo anti-DVUI marcado con Sulfo a una concentración de 2 ug/ml y se dejó incubar durante 1 hora, seguido de un lavado final de 150 µl con 1x PBS + Tween-20 al 0.05 %. Tras añadir 150 µl de tampón de lectura MSD, la placa se leyó en un lector MSD QuickPlex SQ120. Los datos se analizaron utilizando un ajuste logístico de cuatro parámetros (4PL) en GraphPad Prism 8.

Resultados

Los resultados de los análisis de afinidad pueden encontrarse a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8: determinación de afinidad de DVUI por TNF (MSD)

ID del DVUI	SEQ ID NO	Valencia/ mutación en que DVUI	K _D (M)
T04380001 (tipo natural)	19	Tri / C-terminal	1.6E-11
T043800002	20	Tri / C-terminal	1.3E-11
T043800004	22	Tri / C-terminal	3.4E-11
T043800005	23	Tri / C-terminal	1.2E-11
T043800008	26	Tri / C-terminal	1.5E-11
T043800012	30	Tri / C-terminal	1.6E-11
T043800016	34	Tri / C-terminal	3.4E-12

Como puede verse en la tabla 8, la afinidad de los DVUI glicosilados frente al DVUI de referencia de tipo natural es comparable. Esto demuestra que los DVUI glicosilados mantienen su alta afinidad por su diana.

Ejemplo 11: Perfil de glicanos de las glicoproteínas de DVUI

El patrón de los glicanos en las glicoproteínas de DVUI T043800002 (SEQ ID NO: 20), T043800004 (SEQ ID NO: 22), T043800005 (SEQ ID NO: 23), T043800006 (SEQ ID NO: 24), T043800008 (SEQ ID NO: 26), T043800012 (SEQ ID NO: 30) y T043800016 (SEQ ID NO: 34) se analizó adicionalmente mediante LC-MS.

Las muestras para el análisis de glicanos se prepararon según el protocolo RapiFluor-MS (Waters). Las muestras se diluyeron 9:31 usando acetonitrilo:dimetilformamida (Waters) 2.1:1 antes del análisis. Las muestras se analizaron en un 6545XT LC-QTOF, junto con el patrón de prueba de rendimiento RapiFluor-MS (Waters) utilizando un gradiente lineal del 25 % de formiato de amonio 50 mM, pH 4.4 (Waters) en agua (Fisher) al 56 % de acetonitrilo (Thermo Scientific) a 0.4 ml/min durante 35 minutos con la columna (Glycan BEH Amide, Waters) mantenida a 60 °C. Los datos se analizaron utilizando Expressionist de Genedata.

Resultados

En las figuras 1 y 2 se muestran ejemplos de patrones de glicanos de las glicoproteínas de DVUI en LC-QTOF. Todas las glicoproteínas de DVUI mostraron un patrón similar de especies de glicanos; normalmente contenían una alta proporción de glicanos que contenían ácido siálico tales como G1FS1, G2FS1 y G2FS2, además de glicanos neutros tales como G0F, G1F y G2F. La cantidad de las especies

de glicanos varió ligeramente entre las glicoproteínas de DVUI. Las especies sialiladas con uno o dos ácidos siálicos estuvieron más abundantemente presentes.

Ejemplo 12: Conjugación de bis-manosa 6-fosfato

Las glicoproteínas de DVUI T043800005 (SEQ ID NO: 23), T043800002 (SEQ ID NO: 20),
 5 T043800124 (SEQ ID NO: 73), T043800125 (SEQ ID NO: 74), T043800126 (SEQ ID NO: 75), T043800127 (SEQ ID NO: 76), T043800128 (SEQ ID NO: 77) y T043800129 (SEQ ID NO: 78) se usaron en conjugación con bis-manosa 6-fosfato (bis-M6P).

La conjugación de bis-manosa 6-fosfato (producido internamente) que contenía glicano con los DVUI glicosilados se completó oxidando primero el DVUI con peryodato de sodio (Sigma) a
 10 concentraciones de 2.5 mg/ml y 20 mM, respectivamente, en acetato de sodio (Sigma) 100 mM, pH 5.6, a 4 °C durante 30 minutos con agitación suave. A continuación, la reacción se inactivó con glicerol al 3 % (Sigma) a 4 °C durante 15 minutos. El DVUI se purificó mediante filtro de corte de peso molecular (Millipore) en acetato de sodio 100 mM, pH 5.6 centrifugando durante un mínimo de cinco intercambios.

Después de determinar la concentración de proteína mediante Stunner (Unchained Labs), el DVUI
 15 oxidado se conjugó con glicano bis-M6P en acetato de sodio 100 mM, pH 5.6. Se dejó que la reacción se desarrollara a temperatura ambiente durante al menos 16 horas, agitando suavemente. A continuación, el DVUI se purificó mediante filtro de corte de peso molecular en PBS centrifugando durante un mínimo de cinco intercambios. A continuación, la concentración y polidispersidad de DVUI resultantes se determinaron mediante Stunner. A continuación, se completaron LC-QTOF de masa intacta y MALDI-TOF para analizar
 20 los conjugados (protocolos descritos a continuación).

Protocolo de análisis de masa intacta LC-QTOF

Las muestras para el análisis de masa intacta se diluyeron a 1 mg/ml antes de añadir DTT 20 mM (concentración final, Sigma) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. A continuación, las muestras se analizaron en un LC-QTOF 6545XT (Agilent) utilizando un gradiente lineal de agua al 75 % + ácido fórmico
 25 al 0.1 % (Fisher) a acetonitrilo al 60 % + ácido fórmico al 0.1 % (Fisher) a 0.5 ml/min durante 7.5 minutos con la columna (PLRP-S, Agilent) mantenida a 60 °C. Los datos se analizaron utilizando Expresionist (Genedata).

Protocolo de análisis MALDI-TOF

Las muestras para MALDI-TOF se llevaron primero a 1 mg/ml con diluyente de muestra, ácido
 30 fórmico al 0.1 % (Sigma) en agua, antes de mezclarse 1:1 con solución de matriz, acetonitrilo al 50 % y ácido fórmico al 1 % en agua. Las muestras diluidas de matriz se depositaron 3 veces en una placa diana MALDI (Bruker) y se dejaron secar a temperatura ambiente. A continuación, las réplicas de la muestra se analizaron en un instrumento MALDI-TOF (Bruker) con datos analizados mediante el software FlexAnalysis (Bruker).

Resultados

El análisis MALDI-TOF de los conjugados con T043800005 puede verse en la Figura 3. Los conjugados con uno y dos bis-M6P por DVUI son visibles. Se obtuvo un grado promedio de etiquetado (DoL) de 0.9 bis-M6P por DVUI.

El análisis MALDI-TOF de los conjugados con T043800002 puede verse en la Figura 4. Los conjugados con uno, dos y tres bis-M6P por DVUI son visibles. Se obtuvo un grado promedio de etiquetado (DoL) de 2.1 bis-M6P por DVUI.

Ejemplo 13: Conjugación con PROTAC

5 La glicoproteína de DVUI T043800005 (SEQ ID NO: 23) se conjugó adicionalmente con un enlazador alcoxiamina-DBCO seguido de PROTAC. La conjugación del degradador PROTAC BRD4-5-CO-PEG3-N3 (PROTAC, MedChemExpress) con el DVUI glicosilado T043800005 se completó oxidando primero el DVUI con peryodato de sodio a concentraciones de 2.5 mg/ml y 20 mM, respectivamente, en acetato de sodio 100 mM, pH 5.6. Se dejó que la oxidación siguiera a 4 °C durante 30 minutos con agitación suave
10 antes de inactivarse con glicerol al 3 % a 4 °C durante 15 minutos. A continuación, el DVUI se purificó mediante filtro de corte de peso molecular en acetato de sodio 100 mM, pH 5.6 centrifugando durante un mínimo de cinco intercambios.

Después de determinar la concentración de proteína mediante Stunner, el DVUI se acopló a continuación con Aminooxi-PEG2-bis-PEG3-DBCO (enlazador, Conju-Probe) a concentraciones finales de
15 2.5 mg/ml para ambos materiales en acetato de sodio 100 mM, pH 5.6. Se dejó que la reacción se desarrollara a temperatura ambiente durante al menos 16 horas, agitando suavemente. A continuación, el DVUI se purificó mediante filtro de corte de peso molecular en PBS centrifugando durante un mínimo de cinco intercambios.

Después de la purificación, la concentración de proteína se determinó mediante Stunner, y después
20 el DVUI se conjugó con PROTAC a concentraciones finales de 2.5 y 1.8 mg/ml, respectivamente, en PBS. Se dejó que la reacción se desarrollara a temperatura ambiente durante al menos 16 horas, agitando suavemente. A continuación, el DVUI se purificó mediante un filtro de corte de peso molecular en PBS, centrifugando durante un mínimo de cinco intercambios. A continuación, la concentración y polidispersidad de DVUI resultantes se determinaron mediante Stunner. A continuación, se completaron SDS-PAGE, el
25 protocolo mostrado a continuación y el protocolo MALDI-TOF descrito en el Ejemplo 12 para analizar las conjugaciones.

Protocolo de SDS-PAGE

Las muestras para SDS-PAGE se diluyeron primero a 1 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco). A continuación, las muestras se incubaron a 70 °C durante 10 minutos. Después de
30 la incubación, las muestras se mezclaron con tampón de muestra 4X NuPAGE LDS (Invitrogen) y agua antes de cargarse en un gel NuPAGE bis-tris (Invitrogen) al 4-12 % junto con la escalera estándar PageRuler (Thermo Scientific). El gel se ejecutó en una célula Xcell Surelock con fuente de alimentación Powerease (Invitrogen) con tampón de ejecución MES (Invitrogen) utilizando configuraciones de gel NuPAGE. Después de la finalización del programa, los geles se extrajeron del casete y se colocaron en
35 tinción InstantBlue (Abcam) durante 15 minutos. A continuación, los geles se visualizaron en un software ChemiDoc Imager e Image Lab (Bio-Rad).

Resultados

Según SDS-PAGE, se observó conjugación con PROTAC a un DoL (grado de etiquetado) de 0.42.

Ejemplo 14: PEGilación

La glicoproteína de DVUI T043800005 (SEQ ID NO: 23) se conjugó adicionalmente con un PEG funcionalizado con alcóxiamina. La conjugación de aminoóxi-PEG de 2 kDa (PEG, BroadPharm) con el DVUI glicosilado T043800005 se completó oxidando primero el DVUI con peryodato de sodio a concentraciones de 2.5 mg/ml y 20 mM, respectivamente, en acetato de sodio 100 mM, pH 5.6, a 4 °C durante 30 minutos con agitación suave. A continuación, la reacción se inactivó con glicerol al 3 % a 4 °C durante 15 minutos. A continuación, el DVUI se purificó mediante filtro de corte de peso molecular en acetato de sodio 100 mM, pH 5.6 centrifugando durante un mínimo de cinco intercambios.

Después de determinar la concentración de proteína mediante Stunner, el DVUI se PEGiló a concentraciones de 2.5 mg/ml y 7.5 mg/ml, respectivamente, en acetato de sodio 100 mM, pH 5.6. Se dejó que la reacción se desarrollara a temperatura ambiente durante al menos 16 horas, agitando suavemente. A continuación, el DVUI se purificó mediante un filtro de corte de peso molecular en PBS, centrifugando durante un mínimo de cinco veces. A continuación, la concentración y polidispersidad de DVUI resultantes se determinaron mediante Stunner. A continuación, se completaron SDS-PAGE, protocolo descrito en el Ejemplo 13, y MALDI-TOF, protocolo descrito en el Ejemplo 12, para analizar las conjugaciones.

Resultados

Según SDS-PAGE, se observó conjugación con PEG en un DoL de 0.55.

Ejemplo 15: Internalización de TNF- α mediada por una glicovariante de DVUI

Materiales y métodos

Materiales

Se adquirió TNF biotinilado de sistemas de R&D, mientras que la estreptavidina marcada Alexa Fluor™ 647 se adquirió de Thermo Fisher Scientific. Excepto para el glicano bisM6P que se produjo internamente, todos los demás reactivos químicos se adquirieron de Millipore Sigma a menos que se especifique lo contrario.

Expresión y purificación de glicovariante de DVUI

Una glicovariante de DVUI trivalente, T043800005 (SEQ ID NO: 23), se modificó mediante la introducción de un sitio de N-glicosilación con R19N y el mutante se generó utilizando mutagénesis dirigida al sitio. La construcción de DVUI se produjo a partir de células de ovario de hámster chino (CHO). Los protocolos son como se describen en los Ejemplos 1 y 4.

Conjugación de DVUI específica de sitio con glicano bisM6P

La conjugación se realizó basándose en lo que se conoce en la técnica. Brevemente, el DVUI anti-TNF se oxidó con peryodato de sodio 20 mM en tampón de fosfato de sodio (pH 7.2) sobre hielo durante 30 minutos. La reacción de oxidación se protegió de la luz y se inactivó con glicerol (3 % v/v) durante 15 minutos. El DVUI oxidado se sometió a un intercambio de tampón en acetato de sodio 100 mM (pH 5.6) mediante 5 rondas de ultrafiltración a través de filtros centrífugos Amicon® ultra. A continuación, el DVUI desalado se hizo reaccionar con glicano bisM6P a un exceso molar de 30 veces durante una noche a temperatura ambiente. El glicano libre no conjugado se eliminó mediante ultrafiltración utilizando el mismo protocolo que para el DVUI oxidado.

Caracterización de DVUI

El DVUI y los conjugados de DVUI se caracterizaron utilizando análisis de proteína intacta por LC-MS. El ensayo se realizó reduciendo parcialmente DVUI o conjugados DVUI a 0.1 mg/ml con ditioneitol 20 mM a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se inactivó con ácido trifluoroacético al 0.1 % antes de ejecutar las muestras reducidas en un sistema UPLC/MS 1290/6545XT Q-ToF de Agilent.

La UPLC-MS se ejecutó utilizando una columna PLRP de Agilent (2.1 mm x 50 mm, 5 µm) a 55 °C con una fase móvil A (ácido fórmico al 0.1 % en agua) y B (ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo) con un intervalo m/z de 100-9000 Da. Los datos adquiridos se procesaron utilizando el software Expressionist 16.5. Los estados de carga más intensos en cada espectro se utilizaron para la desconvolución utilizando el algoritmo MaxEnt (resolución: 1.0 Da, intervalo de masa 20–200 kDa).

Los pesos moleculares de DVUI y conjugados DVUI bisM6P se midieron utilizando MS MALDI-TOF para determinar el número de copias de glicano bisM6P por DVUI. El análisis se realizó en un Bruker Autoflex III. La masa de proteína intacta se determinó en una placa diana manchada con muestras de DVUI o conjugado mezcladas con matriz de ácido sinapínico utilizando modo positivo lineal. Los datos para cada muestra se adquirieron por triplicado. El número de glicanos bisM6P conjugados por DVUI se calculó restando el peso molecular de DVUI de aquel del conjugado antes de dividir la diferencia por el peso molecular del glicano.

Se realizó cromatografía de líquidos de ultra rendimiento de exclusión por tamaño (SEC-UPLC) en un sistema Water ACQUITY UPLC H-class PLUS Bio. Los DVUI o DVUI conjugados con bisM6P (aproximadamente 5 µg) se separaron en una columna de aumento Superdex 200 de 10/300 gl a temperatura ambiente con un caudal de 0.3 ml/minuto en condiciones isocráticas usando PBS (pH 7.2) como fase móvil.

Caracterización de la internalización de la proteína de interés (POI) mediante citometría de flujo

Se cultivaron células Jurkat o células K562 (ATCC) en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 %, l-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 0.25 µg/ml de anfotericina B, 2-mercaptoetanol 55 µM y HEPES 10 mM (todos de Gibco). Se cultivaron a 1×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo en U.

Se añadieron secuencialmente TNF-α humano recombinante biotinilado y estreptavidina marcada con Alexa Fluor™ 647 a una concentración final de 50 y 100 nM, respectivamente. Posteriormente, el DVUI T043800005 o DVUI conjugado con bisM6P se incluyó a diversas concentraciones entre 0.78-50 nM.

Después de cultivar las células a 37 °C durante 1 o 4 horas, se lavaron dos veces con solución salina fría tamponada con fosfato (PBS) (pH 7.2), a continuación se realizó una citometría de flujo para evaluar la fluorescencia del complejo de TNF que contenía Alexa Fluor™.

Caracterización de la degradación de POI mediante inmunotransferencia tipo Western

Se cultivaron células K562 o células Jurkat a 1×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo en U. Secuencialmente, se añadieron TNF-α humano recombinante (50 nM, Peprotech) y el DVUI anti-TNF (T043800005) o DVUI conjugado con bisM6P a concentraciones finales de 25 nM.

Después de cultivar las células a 37 °C durante 2 horas, se lavaron dos veces con medios y se lisaron con tampón RIPA (Boston BioProducts). Algunas células permanecieron en cultivo durante 4 o 24 horas adicionales en presencia de DMSO o bafilomicina A1 100 nM (InvivoGen).

En cada momento, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron con tampón RIPA.

- 5 La inmunotransferencia tipo Western para detectar TNF- α o β -actina se realizó con lisados preparados utilizando anti-TNF (clon D5G9, Cell Signaling Technology) seguido del módulo de detección anti-conejo (ProteinSimple) o anti- β -actina (clon 8H10D10, Cell Signaling Technology) seguido del módulo de detección anti-ratón (ProteinSimple) usando Jess (ProteinSimple).

- 10 Para medir TNF- α en el sobrenadante de medios después de la internalización, las células K562 (1 x 10⁵ células/pocillo) se trataron con 50 nM de TNF- α y 25 nM de DVUI o DVUI conjugado con bisM6P a 37 °C.

Durante el período de incubación, se recogieron sobrenadantes de medios en diferentes puntos temporales (24, 48 y 72 horas), y se realizó la inmunotransferencia tipo Western con el DVUI o conjugado como se ha mencionado anteriormente.

15 **Resultados**

Los DVUI glicosilados contenían una copia de bisM6P por DVUI según se determinó mediante MS MALDI-TOF.

- 20 El conjugado de DVUI que contenía aproximadamente 1 bisM6P unido a un único sitio de N-glicosilación introducido indujo eficazmente la internalización de TNF- α en células Jurkat o células K562 (Figura 5).

La construcción de DVUI conjugado con bisM6P mostró internalización dependiente de la dosis de TNF- α después de la incubación durante 1 y 4 horas, mientras que se observó internalización reducida a una concentración alta de DVUI de 50 nM, probablemente debido al efecto de gancho (Figura 6).

- 25 Esto se confirmó adicionalmente mediante el análisis por inmunotransferencia tipo Western del lisado celular (Figura 7A) y el sobrenadante (Figura 7B). La cantidad de TNF- α internalizado ya era bastante baja a las 4 horas y no se detectó a las 22 horas después de la incubación. La adición de bafilomicina A1 retrasó significativamente la degradación de TNF- α a las 4 y 22 horas, lo que sugiere que la degradación de TNF- α a través de los DVUI conjugados con bisM6P se produce en lisosomas. También se determinó la cantidad de TNF- α restante en medios de cultivo celular. Aunque hubo poco cambio en los niveles de 30 TNF- α en el sobrenadante de cultivo derivado de células K562 humanas tratadas con el DVUI anti-TNF de control solo, la cantidad de TNF- α se redujo significativamente durante la incubación de células con DVUI conjugados con bisM6P de 24 a 72 horas.

- 35 Esto muestra que la internalización de TNF- α mediada por una glicovariante de DVUI con una copia de bisM6P es eficaz, lo que sugiere que un único bisM6P en un DVUI es suficiente para inducir la internalización y degradación de una POI soluble en el lisosoma.

La siguiente tabla muestra las secuencias divulgadas en el presente documento:

ID del DVUI	SEQ ID	Secuencia
	NO	

5	ALB00606	1	EVQLVESGGGVVQPNGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
	ALB00607	2	EVQLVESGGGVVQPGGSLNLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
	ALB00608	3	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASNFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
10	ALB00609	4	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGNDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
15	ALB00610	5	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSNGT LVTVSS
	ALB00611	6	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT NVTVSS
20	ALB00612	7	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN STNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
25	ALB00613	8	EVQLVESGGGVVQPNGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
	ALB00614	9	EVQLVESGGGVVQPGGSLNLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
30	ALB00615	10	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASNFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
	ALB00616	11	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGNDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
35	ALB00617	12	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSNGT LVTVSS

5	ALB00618	13	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTNVTVSS
	ALB00619	14	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
	ALB00620	15	EVNLTESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
	ALB00621	16	EVNLTESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
	ALB00622	17	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
10	ALB00623	18	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
	T043800001	19	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFN RGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFN RGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSQGT LVTVSS
	T043800002	20	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFN RGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFN RGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVNL TESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSQGT LVTVSS
15	T043800003	21	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYY
20			
25			
30			
35			

5		CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQL NESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLRPEDTALYYCTI GGSLRSSQGTTLTVSS
10	T043800004	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPNGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLRPEDTALYYCTI GGSLRSSQGTTLTVSS
15		
20	T043800005	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLNLSAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLRPEDTALYYCTI GGSLRSSQGTTLTVSS
25		
30	T043800006	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASNFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLRPEDTALYYCTI GGSLRSSQGTTLTVSS
35	T043800007	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM
	25	

5			YWVRQAPGKGGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRRGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVS SISGNGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSQGLTVTVSS
10	T043800008	26	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRRGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRRGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVS SISGSGNDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSQGLTVTVSS
15	T043800009	27	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRRGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRRGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFNISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSQGLTVTVSS
20	T043800010	28	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRRGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRRGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSQGLTVTVSS
25	T043800011	29	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRRGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRRGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSQGLTVTVSS
30			
35			

		VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSNSSQGTLTVTVSS
5		T043800012
10	30	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFN RGQGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFN RGQGTLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSNGTLTVTVSS
15		T043800013
20	31	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFN RGQGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFN RGQGTLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSQGTVTVTVSS
25		T043800014
30	32	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFN RGQGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFN RGQGTLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSQGTLVNVSS
35		T043800015
	33	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFN RGQGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFN RGQGTLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVS

5		SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLRSSQGTLTVSS
10	34	T043800016 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLRSSQGTLTVSS
15	35	T043800055 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLV TVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTTLTVSS
20	36	T043800056 EVQLVESGGGVVQPNGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLV TVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTTLTVSS
25	37	T043800057 EVQLVESGGGVVQPGGSLNLSAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLV

5		TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTLTVSS
10	T043800058	38 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASNFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTLTVSS
15	T043800059	39 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGNGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTLTVSS
20	T043800060	40 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGNDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTLTVSS
35	T043800061	41 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFNISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS

		EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTTLTVSS
5		T043800062
	42	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNNKTTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTTLTVSS
10		T043800063
	43	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSNSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTTLTVSS
15		T043800064
	44	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSNGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTTLTVSS
20		T043800065
	45	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSNNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTTLTVSS
25		
30		
35		

5	T043800066	46	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLV TVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTTLTVSS
10	T043800067	47	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPNG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSS
15	T043800068	48	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLNLSAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSS
20	T043800069	49	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASNFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSS
25	T043800070	50	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGNGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLT
30			
35			

		VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLVTVSS
5		
	51	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGNDTLYADS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGTTLV VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLVTVSS
10		
	52	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFNISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGTTLV TVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLVTVSS
15		
	53	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGTTLV VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLVTVSS
20		
	54	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLNSSQGTTLV VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLVTVSS
25		
	55	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG
30		
35		

5			SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSNGTLVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFN RGQGT LTVTVSS
10	T043800076	56	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFN RGQGT LTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDN SNNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVT TVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFN RGQGT LTVTVSS
15	T043800089	57	EVNLTESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFN RGQGT LVT TVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFN RGQGT LTVTVSS
20			
25	T043800090	58	EVQLNESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFN RGQGT LVT TVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFN RGQGT LTVTVSS
30			
35	T043800091	59	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFN RGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVNLTESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW

		MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSS
5	60	T043800092 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTNTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLV TVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTTLTVSS
15	61	T043800093 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTNLNVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLV TVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTTLTVSS
25	62	T043800094 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLNESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLV TVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSS
35	63	T043800095 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTNTV TVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSS
	64	T043800096 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY

5		CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGT LVNVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTL YLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSS
10	65	T043800097 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSS
15	66	T043800098 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSS
20	67	T043800118 AVNLTESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAIY YCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTTLTVSS
25	68	T043800119 AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAI YCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTTLVNVS
30	69	T043800120 AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN ANNTVDLQMNSLKPEDTAI YCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTTLTVSS
35	70	T043800121 AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN ATNTVDLQMNSLKPEDTAI YCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTTLTVSS
	71	T043800122 AVQLNESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAI YCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTTLTVSS

5	T043800123	72	AVQLVESGGGSVQANGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIY YCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGGLTVTVSS
	T043800124	73	AVQLVESGGGSVQAGGSLNLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGGLTVTVSS
	T043800125	74	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASNRTSRSYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIY YCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGGLTVTVSS
10	T043800126	75	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGNSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGGLTVTVSS
15	T043800127	76	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFNISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGGLTVTVSS
	T043800128	77	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGNGTLTVTVSS
20	T043800129	78	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTNVTVSS
25	T043800130	79	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGGLTVTVSS
	T043800131	80	EVQLNESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGL EWWSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALY YCARSPSGFNRGQGGLTVTVSS
	T043800133	81	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGNITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGGLTVTVSS
30	T043800134	82	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFNISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGGLTVTVSS
35	T043800135	83	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTNVTVSS

5	T043800136	84	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTLVNVSS
	T043800137	85	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNATNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTLTVSS
	T043800138	86	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTLTVSS
10	T043800139	87	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGTLVNVSS
15	T043800143	88	EVQLVESGGGVVQPNGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYCR SPRYADQWSAYDYWGQGTLTVSS
	T043800144	89	EVQLVESGGGVVQPGGSLNLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGTLTVSS
20	T043800145	90	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASNFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGTLTVSS
	T043800146	91	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDNTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGTLTVSS
25	T043800147	92	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFNISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGTLTVSS
	T043800148	93	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGNGTLTVSS
30	T043800149	94	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGTNVTSS
	T043800150	95	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGTLTVSS
35			

5	T043800159	96	NVSLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSS
	T043800161	97	DVNLTESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGTTLTVSS
	T043800178	98	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANKNTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGG SLSRSSQGTTLTVSS
10			
15	T043800179	99	AVNLTESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANKNTVDLQMNSLKPEDTAIY YCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSL SRSSQGTTLTVSS
	T043800180	100	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANKNTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTTLNVSSGGGGSGGGSEVQLV ESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG GSLSRSSQGTTLTVSS
20			
25	T043800181	101	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANKNTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGG SLSRSSQGTTLTVSS
	T043800182	102	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTNTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGG SLSRSSQGTTLTVSS
30			
35	T043800183	103	AVQLNESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANKNTVDLQMNSLKPEDTAI

			YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGG SLSRSSQGTTLTVTVSS
5	T043800184	104	AVQLVESGGGSVQANGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAIY YCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSL SRSSQGTTLTVTVSS
10			
	T043800185	105	AVQLVESGGGSVQAGGSLNLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGG SLSRSSQGTTLTVTVSS
15			
	T043800186	106	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASNRTSRSYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAIY YCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSL SRSSQGTTLTVTVSS
20			
	T043800187	107	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGNSTGYADSVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGG SLSRSSQGTTLTVTVSS
25			
	T043800188	108	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTNTVTVSSGGGGSGGGSEVQLV ESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG GSLSRSSQGTTLTVTVSS
30			
	T043800189	109	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGGSVQAGG SLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYAD
35			

		SVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAAGSTWYGTLYE YDAWGQGTTLTVSS
5	110	T043800190 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSAVNLTESGGGSGVQAGG SLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAAGSTWYGTLYE YDAWGQGTTLTVSS
10	111	T043800191 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGGSGVQAGG SLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAAGSTWYGTLYE YDAWGQGTTLVNVSS
15	112	T043800192 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGGSGVQAGG SLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAAGSTWYGTLYE YDAWGQGTTLTVSS
20	113	T043800193 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGGSGVQAGG SLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAAGSTWYGTLYE YDAWGQGTTLTVSS
25	114	T043800194 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSAVQLNESGGGSGVQAGG SLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAAGSTWYGTLYE YDAWGQGTTLTVSS
30	115	T043800195 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGGSGVQANG SLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAAGSTWYGTLYE YDAWGQGTTLTVSS
35		

5

10

15

20

25

30

35

T043800196	116	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGG SVQAGG SLNLTCAASGRTSR SYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA AAGSTWYGTLYE YDAWGQGT LTVSS
T043800197	117	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGG SVQAGG SLRLTCAASNRTSR SYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA AAGSTWYGTLYE YDAWGQGT LTVSS
T043800198	118	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGG SVQAGG SLRLTCAASGRTSR SYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGNSTGYAD SVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA AAGSTWYGTLYE YDAWGQGT LTVSS
T043800199	119	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGG SVQAGG SLRLTCAASGRTSR SYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFNISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA AAGSTWYGTLYE YDAWGQGT LTVSS
T043800200	120	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGG SVQAGG SLRLTCAASGRTSR SYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA AAGSTWYGTLYE YDAWGN GT LTVSS
T043800201	121	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGT LTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGG SVQAGG SLRLTCAASGRTSR SYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA AAGSTWYGTLYE YDAWGQGT NVTVSS
T043800202	122	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY

			CRSPRYADQWSAYDYWGQGGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS SQGTLTVTVSS
5	T043800203	123	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGGLTVNVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSG SDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLR SSQGTLTVTVSS
10			
15	T043800204	124	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS SQGTLTVTVSS
20	T043800205	125	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS SQGTLTVTVSS
25	T043800206	126	EVQLNESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS SQGTLTVTVSS
30	T043800207	127	EVQLVESGGGVVQPNGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS SQGTLTVTVSS
35	T043800208	128	EVQLVESGGGVVQPGGSLNLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS

		DTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRS SQGTLTVSS
5	129	T043800209 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASNFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRS SQGTLTVSS
10	130	T043800210 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDNTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRS SQGTLTVSS
15	131	T043800211 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFNISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRS SQGTLTVSS
20	132	T043800212 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGN GT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRS SQGTLTVSS
25	133	T043800213 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGT NTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSG SDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSR SSQGTLTVSS
30	134	T043800214 DVNLTESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRS SQGTLTVSS
35		

5	T043800215	135	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISGIDGTTYDEPV KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW GQGLTVTVSS
10	T043800216	136	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISGIDGTTYDEPV KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW GQGLTVNVSS
15	T043800217	137	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISGIDGTTYDEPV KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW GQGLTVTVSS
20	T043800218	138	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISGIDGTTYDEPV KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW GQGLTVTVSS
25	T043800219	139	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLNESGGGVVQPGG SLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISGIDGTTYDEPV KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW GQGLTVTVSS
30	T043800220	140	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPNG SLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISGIDGTTYDEPV KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW GQGLTVTVSS
35	T043800221	141	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY

			YCTIGGSLRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLNLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISIGIDGTTYDEPV KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW GQGTTLTVSS
5	T043800222	142	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCTASNFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISIGIDGTTYDEPV KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW GQGTTLTVSS
10			
15	T043800223	143	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISIGIDNTTYDEPV KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW GQGTTLTVSS
20	T043800224	144	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISIGIDGTTYDEPV KGRFNISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDY WGQGTTLTVSS
25	T043800225	145	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISIGIDGTTYDEPV KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW GN GTTLTVSS
30	T043800226	146	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISIGIDGTTYDEPV KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW GQGT NTVSS
35	T043800227	147	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSDVNLTESGGGVVQPGG SLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISIGIDGTTYDEPV

5			KGRFTISRDNSKNTVY LQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW GQGT LVT VSS
	T043800228	148	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFNISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLS CAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRPEDTALYYCTIGG SLSRSSQGT LVT VSS
10	T043800229	149	AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKER EFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAI YYCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGNGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLS CAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRPEDTALYYCTIGG SLSRSSQGT LVT VSS
15	Enlazador 5GS	150	GGGGS
20	Enlazador 9GS	151	GGGGSGGGS
	Enlazador 15GS	152	GGGGSGGGSGGGGS
	Enlazador 35GS	153	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
25	VTVSS(X) ₁₀	154	VTVSSXXXXXXXXXX
	Secuencia C- terminal	155	VKVSS
	Secuencia C- terminal	156	VQVSS
30	Secuencia C- terminal	157	VTVKS
	Secuencia C- terminal	158	VTVQS
	Secuencia C- terminal	159	VKVKS
35	Secuencia C- terminal	160	VKVQS
	Secuencia C- terminal	161	VQVKS

5	Secuencia C-terminal	162	VQVQS
	Extensión de Ala	163	VTVSSA
	Extensión de Ala	164	VKVSSA
	Extensión de Ala	165	VQVSSA
	Extensión de Ala	166	VTVKSA
10	Extensión de Ala	167	VTVQSA
	Extensión de Ala	168	VKVKSA
	Extensión de Ala	169	VKVQSA
15	Extensión de Ala	170	VQVKSA
	Extensión de Ala	171	VQVQSA
	VTVSS(X) ₁	172	VTVSSX
	VTVSS(X) ₂	173	VTVSSXX
	VTVSS(X) ₃	174	VTVSSXXX
20	VTVSS(X) ₄	175	VTVSSXXXX
	VTVSS(X) ₅	176	VTVSSXXXXX
	T043800899	177	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQAPGKGLE WVSEINTNGSITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGLTVTVSS
25	T043800901	178	NVSLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSS
	T043800902	179	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGNDSTTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALY YCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSS
30	T043800969	180	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDNWSQGGLTVTVSS

5

T043800970	181	NVSLVESGGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKERE FVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIY YCAAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSL SRSSQGTLVTVSS
T043800971	182	NVSLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLRPEDTALYY CRSPRYADQWSAYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS SQGTLVTVSS
T043800972	183	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSNVSLVESGGGGSVQAGG SLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSTWYGTLYE YDAWGQGTLVTVSS
T043800973	184	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSNVSLVESGGGVVQPGG SLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISGIDGTTYDEPV KGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYW QGTLVTVSS
T043800974	185	NVSLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLV TVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTLVTVSS
T043800975	186	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTLVTVSSGGGGSGGGSNVSLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVT

10

15

20

25

30

35

		VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSS
5		EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSNVSL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKPEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLRSSQGTTLTVSS
10	T043800976	187
15	T043800977	188
20		EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGNDSTYYDEPVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALY YCRSPRYADQWSAYDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKPEWVSSISGSG SDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSR SSQGTTLTVSS
25	T043800978	189
30		EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGGSVQAGG SLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREVSGISWNGSSTGYAD SVKGRFTISRDNANTVLDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSTWYGTLYE YDAWGQGTTLTVSS
35	T043800979	190
		EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKPE WVSSISGNGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTTLTVSS
	T043800980	191
		EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLRSSQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTTLV

5			TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTLTVSS
10	T043800981	192	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLTVSS
15	T043800982	193	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSAVQLVESGGGSVQAGG SLRLTCAASGRTSRSYGMWFRQAPGKEREVSGISWRGDSTGYAD SVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSTWYGTLYE YDNWSQGTLTVSS
20	T043800983	194	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALY YCTIGGSLSNSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCAR SPSGFNRGQGTLTVSS
30	T043800984	195	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSNSSQGTLVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTLTVSS
35	T043800985	196	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTALYY CARSPSGFNRGQGTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG

5		SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM YWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLRPEDTALYYCARSPSGFNRRGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPWWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLNSSLQGLTVTVSS
---	--	---

10

15

20

25

30

35