

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 540**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2013** **PCT/US2013/043684**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013** **WO13184514**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2013** **E 13729859 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018** **EP 2855520**

54 Título: **Métodos de marcación específicos del sitio y moléculas producidas de este modo**

30 Prioridad:

04.06.2012 US 201261655143 P

12.03.2013 US 201361777430 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2019

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel , CH

72 Inventor/es:

GEIRSTANGER, BERNHARD HUBERT;

GRUNEWALD, JAN y

BURSULAYA, BADRY

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

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

ES 2 703 540 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de marcación específicos del sitio y moléculas producidas de este modo

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso de marcación específico del sitio y a las moléculas producidas por el mismo.

Antecedentes

La conjugación se ha usado ampliamente para optimizar las propiedades de proteínas biológicamente activas, tales como terapias con proteínas, conjugados de fármacos de anticuerpos (ADC), vacunas, vehículos de direccionamiento selectiva a tejidos, diagnósticos moleculares y conjugados de ácidos nucleicos de proteínas. El método de conjugación tradicional utiliza el enlace covalente basado en lisina, lo que dificulta el logro de homogeneidad debido a la abundancia de lisinas en la superficie de la proteína.

La marcación específica del sitio de proteínas se puede lograr mediante reacciones enzimáticas postraduccion, por ejemplo, usando O⁶-alquilguanina-ADN-alquil-transferasa (AGT) humana, biotina ligasa, transglutaminasa, sortasa, cutinasa o 4'-fosfopanteteinil transferasas para la unión covalente de una etiqueta a una proteína.

Para las reacciones enzimáticas postraduccion que utilizan O⁶-alquilguanina-ADN-alquil-transferasa humana, la AGT se fusiona con una proteína diana de interés, seguida de la adición de una O⁶-bencilguanina marcada, que es un sustrato suicida para la AGT (Keppler et al., Nat. Biotechnol. 21: 86-89, 2003). Esta metodología es la base de una tecnología llamada SNAP-tagTM, que utiliza una etiqueta de 180 aminoácidos (Tirat et al., International Journal of Biological Macromolecules, 39: 66-76, 2006). Sin embargo, la marcación de proteínas utilizando esta metodología se produce solo en los extremos C- o N-.

Para la ligación de biotina, la enzima biotina proteína ligasa (BPL) une la biotina al dominio portador de biotina de ciertas carboxilasas o descarboxilasas. La BPL cataliza, en dos etapas, la reacción dependiente de adenosina-5'-trifosfato (ATP), la formación postraduccion de un enlace amida entre el grupo carboxilo de la biotina y el grupo ε-amino de un residuo de lisina específico ubicado dentro de un motivo de reconocimiento de Ala-Met-Lys-Met (SEQ ID NO: 1017) altamente conservado dentro del dominio portador de biotina (Tirat et al., International Journal of Biological Macromolecules, 39: 66-76, 2006). Esta metodología se puede utilizar para crear etiquetas de fusión en el extremo C-, el extremo N- o incluso dentro de la proteína objetivo y es la base para una tecnología llamada BioEaseTM (etiqueta de 72 aminoácidos) y AviTagTM (utiliza la biotina ligase, BirA y la etiqueta peptídica aceptora de 15 residuos (AP)).

Las transglutaminasas catalizan la formación de enlaces isopeptídicos estables entre las cadenas laterales de glutamina (Gln) y lisina (Lys) con la pérdida de amoníaco, y se han utilizado para etiquetar cadenas laterales de glutamina en proteínas con fluoróforos *in vitro* (Sato et al., Biochemistry 35: 13072-13080, 1996). Además, se han utilizado transglutaminasas de tejido bacteriano y humano (BTGase y TG2) para catalizar la modificación postraduccion de diferentes IgG a través de las cadenas laterales de Lys o Gln ubicadas en la cadena pesada de IgG (Mindt et al., Bioconjugate Chem. 19: 271-278, 2008; Jeger et al., Angew. Chem. Int. 49: 9995-9997, 2010).

Las sortasas se han usado para la modificación de proteínas del sitio C- terminal y N- terminal, donde la sortasa A cataliza la reacción de transpeptidación (Antos et al., JACS, 131: 10800-10801, 2009).

La cutinasa es una serina esterasa de 22 kDa que forma un aducto covalente específico del sitio con ligandos de fosfonato que es resistente a la hidrólisis. Las cutinasas se han utilizado para la modificación de anticuerpos específicos para el sitio C-terminal y N-terminal, seguida de la inmovilización sobre superficies (Kwon et al., Anal. Chem. 76: 5713-5720, 2004; Hodneland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 5048-5052, 2002).

La 4'-fosfopanteteinilación de las proteínas transportadoras de acilo (ACP) y las proteínas transportadoras de peptidilo (PCP) están implicadas en una modificación postraduccion esencial que se requiere para activar la síntesis de metabolitos por policétidos sintetas (PKS) y péptido sintetas no ribosómicas (NRPS)), respectivamente (Fischbach et al., Chem. Rev. 106 (8): 3468-3496, 2006). La conversión de apo a holo de las ACP y PCPs es catalizada por las 4'-fosfopanteteína (ppan) transferasas, que unen una unidad estructural 4'-fosfo-panteteinilo de la coenzima A (CoA) a un residuo de serina invariante de los dominios de proteínas (Lambalot et al., Chem. Biol. 3(11): 923-936, 1996). Debido al tamaño comparativamente pequeño de las proteínas portadoras y la capacidad de las 4'-fosfopanteteinil transferasas para aceptar análogos de CoA funcionalizados como sustratos, los investigadores han usado proteínas portadoras como etiquetas de fusión para marcar proteínas diana con una variedad de sondas de moléculas pequeñas (véase, por ejemplo, La Clair et al., Chem. Biol. 11(2): 195-201, 2004; Yin et al., J. Am. Chem. Soc. 126(25): 7754-7755, 2004). En un esfuerzo por reducir aún más el tamaño de la etiqueta de la proteína portadora, Walsh y sus colaboradores utilizaron la presentación de fagos para identificar los péptidos de 8 a 12 residuos que se reconocen como sustratos eficientes por la 4'-fosfopanteteinil transferasa Sfp bacteriana (identificada previamente como locus genético responsable de la producción de surfactina) y AcpS (Yin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(44): 15815-15820, 2005; Zhou et al., ACS Chem. Biol. 2(5): 337-346, 2007; Zhou et al., J. Am. Chem. Soc. 130(30): 9925-9930, 2008). El documento WO2007/041689 describe la marcación de moléculas proteicas y no proteicas usando una

reacción de fosfopanteteinilación, en donde la marcación específica del sitio de proteínas se logra a través de la fusión de proteínas con sustratos peptídicos recientemente identificados de 4'-fosfopanteteinil-transferasas.

Los conjugados de fármaco de anticuerpo (ADC) se han utilizado para el suministro local de agentes citotóxicos en el tratamiento del cáncer (véase, por ejemplo, Lambert, Curr. Opinion In Pharmacology 5: 543-549, 2005). Los ADC permiten la administración dirigida de la unidad estructural del fármaco donde se puede lograr la máxima eficacia con una toxicidad mínima. A medida que más ADC muestran resultados clínicos prometedores, existe una mayor necesidad de desarrollar anticuerpos manipulados estables que proporcionen grupos reactivos capaces de conjugación con diversos agentes, especialmente conjugaciones específicas del sitio que puedan generar inmunoconjugados homogéneos con una relación definida de fármaco a anticuerpo para su uso en la terapia del cáncer.

Resumen

La presente descripción se refiere a anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos, que comprenden al menos una etiqueta peptídica que es un sustrato de 4'-fosfopanteteinil-transferasa, y está localizada dentro del bucle estructural de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. La presente divulgación se refiere a inmunoconjugados que comprenden dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados, y un grupo terminal. La presente divulgación también se refiere a métodos para producir tales anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados y los inmunoconjugados, así como a métodos para usar tales composiciones.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo modificado o fragmentos del mismo, que comprenden al menos una etiqueta peptídica que es un sustrato de 4'-fosfopanteteinil-transferasa, y está localizada dentro del bucle estructural de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y en donde la 4'-fosfopanteteinil-transferasa es Sfp, AcpS, PPTasa de *T. maritima*, PPTasa humana o una forma mutante u homóloga de la misma que retiene la actividad de la 4'-fosfopanteteinil-transferasa; y en donde la etiqueta peptídica se selecciona del grupo que consiste en:

GDSLWLLRLLN (SEQ ID NO: 1),

GDSLWL (SEQ ID NO: 2),

GDSLWLVRCNL (SEQ ID NO: 3),

GDSLWLLRCLN (SEQ ID NO: 4),

GDSLWLVRLN (SEQ ID NO: 5),

GDSLWLLRSLN (SEQ ID NO: 6),

GSQDVLDSEFIASKLA (SEQ ID NO: 7),

VLDSEFIASKLA (SEQ ID NO: 8),

DSEFIASKLA (SEQ ID NO: 9),

GDSLDMLEWSLM (SEQ ID NO: 10),

GDSLDMLEWSL (SEQ ID NO: 11),

GDSLDMLEWS (SEQ ID NO: 12),

GDSLDMLEW (SEQ ID NO: 13),

DSLDMLEW (SEQ ID NO: 14),

GDSLDM (SEQ ID NO: 15),

LDSVRMMALAAR (SEQ ID NO: 16),

LDSLDMLEWSLR (SEQ ID NO: 17),

DSEFIASKL (SEQ ID NO: 18),

DSEFIASK (SEQ ID NO: 19),

DVLDSEFI (SEQ ID NO: 20),

VLDSEFIAS (SEQ ID NO: 21), y

DSLDMLEWSL (SEQ ID NO: 1132),

y en donde la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 110 y 111 de la cadena ligera, o la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 119 y 120, o entre los residuos de aminoácidos 120 y 121, o entre los residuos de aminoácidos 135 y 136, o entre los residuos de aminoácidos 136 y 137, o entre los residuos de aminoácidos 138 y 139, o entre los residuos de aminoácidos 162 y 163, o entre los residuos de aminoácidos 164 y 165, o entre los residuos de aminoácidos 165 y 166, o entre los aminoácidos residuos 194 y 195, o entre los residuos de aminoácidos 195 y 196 del dominio CH1; o la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 388 y 389 del dominio CH3; en donde los aminoácidos están numerados de acuerdo con el sistema de numeración Eu.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo modificado o fragmentos del mismo, en donde la etiqueta peptídica se selecciona del grupo que consiste en:

GDSLDMLEWSLM (SEQ ID NO: 10),

GDSLDMLEWSL (SEQ ID NO: 11),

GDSLDMLEWS (SEQ ID NO: 12),

GDSLDMLEW (SEQ ID NO: 13),

DSLDMLEW (SEQ ID NO: 14), y

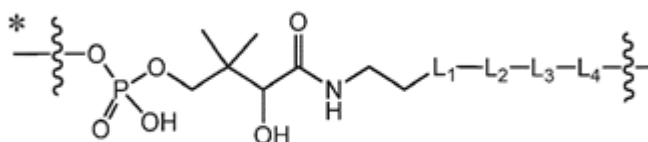
DSLDMLEWSL (SEQ ID NO: 1132),

en donde la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 110 y 111 de la cadena ligera, o la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 119 y 120, o entre los residuos de aminoácidos 120 y 121, o entre los residuos de aminoácidos 135 y 136, o entre los residuos de aminoácidos 136 y 137, o entre los residuos de aminoácidos 165 y 166 del dominio CH1, o entre los residuos de aminoácidos 388 y 389 del dominio CH3.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados que comprenden SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:267, SEQ ID NO:268, SEQ ID NO:277, SEQ ID NO:278, SEQ ID NO:356, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:365, SEQ ID NO:367, SEQ ID NO:371, SEQ ID NO:373, SEQ ID NO:374, SEQ ID NO:380, SEQ ID NO:381, o SEQ ID NO:384.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados de la invención son un isotipo seleccionado de IgG, IgM, IgE e IgA. En algunas otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados de la invención son un subtipo de IgG seleccionado de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados de la invención son un anticuerpo humano o humanizado o fragmento de anticuerpo. En una realización específica, el anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo de la invención es un anticuerpo anti-HER2 o fragmento de anticuerpo anti-HER2. La presente invención proporciona además inmunoconjugados que comprenden dichos anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos.

La presente invención proporciona además inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo y un grupo terminal; en donde dicho grupo terminal está unido al anticuerpo modificado o al fragmento de unión a antígeno del mismo mediante un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la Fórmula (I-b):



Fórmula (I-b),

En donde:

L₁ es un enlace, un enlazador no enzimáticamente escindible, un enlazador no escindible; un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible;

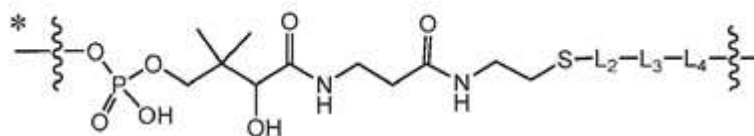
L₂ es un enlace, un enlazador no escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible; un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible;

L₃ es un enlace, un enlazador no escindible enzimáticamente, un enlazador no escindible; un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible;

L₄ es un enlace, un enlazador no enzimáticamente escindible, un enlazador no escindible; un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable, un enlazador fotoescindible o un espaciador autoinmolante,

5 el * denota donde la unidad estructural 4'-fosfopanteteinil está unido a la etiqueta del péptido, y en donde el grupo terminal es una unidad estructural de fármaco, una sonda de afinidad, un quelante, una sonda espectroscópica, una sonda radioactiva, un reactivo de imagen, una molécula lipídica, un polietilenglicol, un polímero, una nanopartícula, un punto cuántico, un liposoma, una partícula de PLGA, un polisacárido, un grupo acetilo o una superficie;

o el enlazador tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (I-c):



Fórmula (I-c),

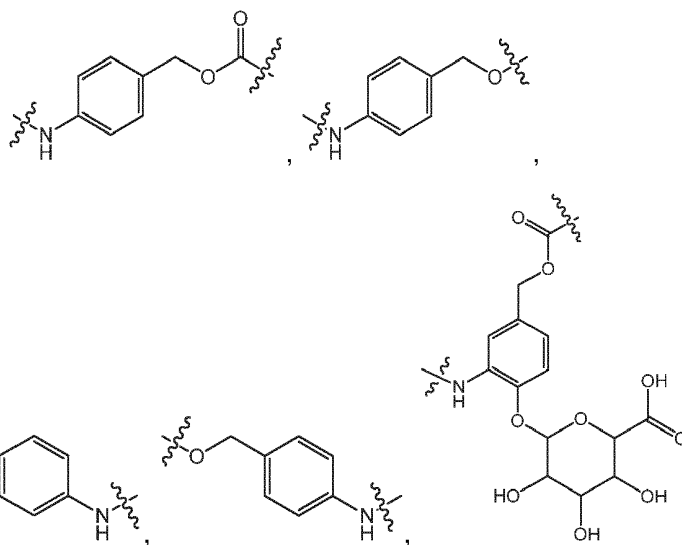
10

en donde

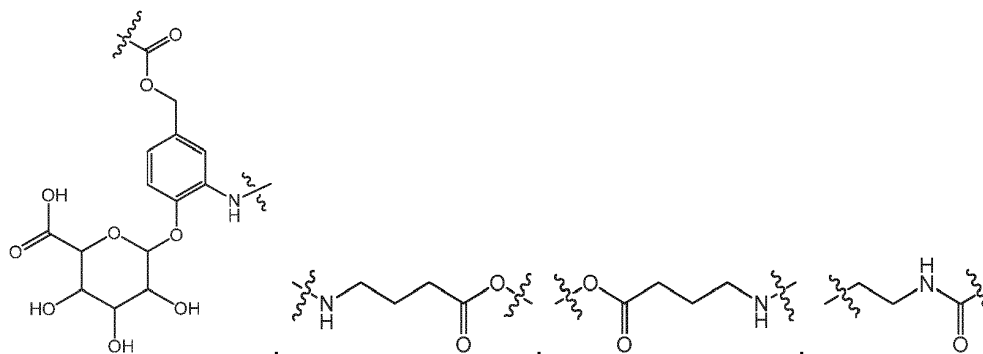
L_2 es un enlace, $-A_2-$, o $-A_2X^{2-}$;

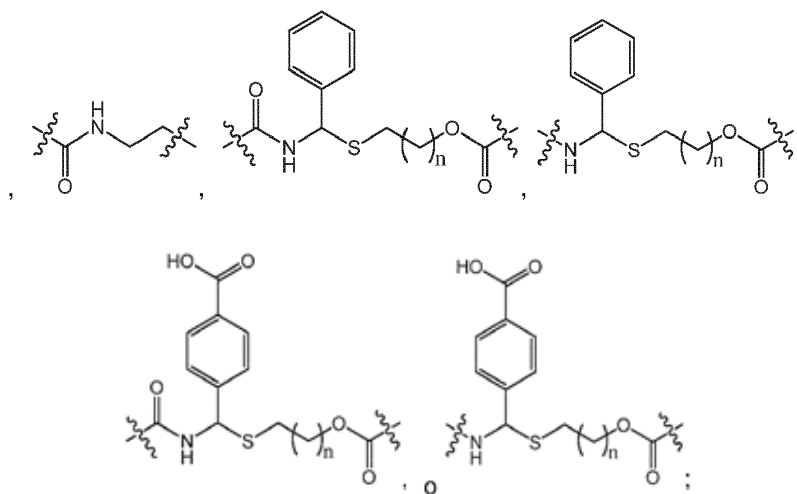
L_3 es un enlace, $-A_3-$, o $-A_3X^{2-}$;

L_4 es un enlace, $-A_4-$, $-A_4X^2-$,



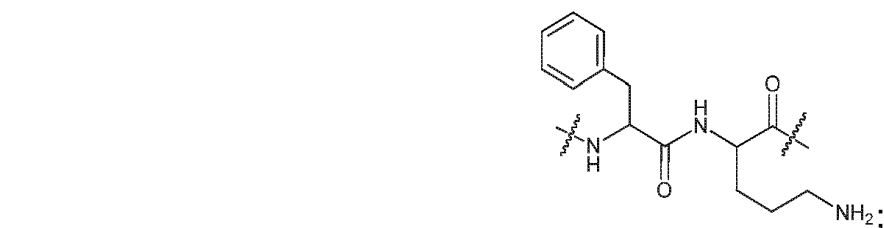
15



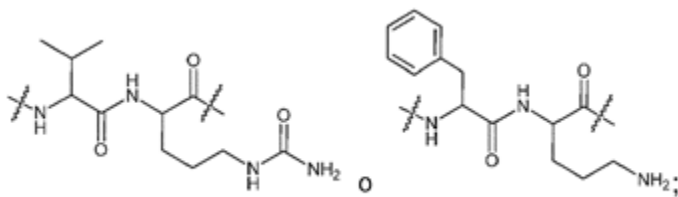


5 A₁ es -C(=O)NH-, -NHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -O(CH₂)_nm-, -O(C(R⁴)₂)_nm-, -((CH₂)_nO)_m-,
 -((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -CH₂)_nC(=O)NH-, -C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -CH₂)_nNHC(=O)-,
 -C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -
 C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -CH₂)_nC(=O)-, -C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -CH₂)_n(O(CH₂)_nmNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_nmNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -O(CH₂)_nmNHC(=O)(CH₂)_n-, o-
 10 (O(C(R⁴)₂)_nmNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

A₂ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -O(CH₂)_nm-, -O(C(R⁴)₂)_nm-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-,
 -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -CH₂)_nC(=O)NH-, -C(R⁴)₂)_nC(=O)NR⁴-, -CH₂)_nNHC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -CH₂)_nS-, -C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-, -CH₂)_nNH-, -C(R⁴)₂)_nNH-, -
 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 -CH₂)_nC(=O)-, -C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -CH₂)_n(O(CH₂)_nmNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_nmNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 -CH₂)_n(O(CH₂)_nmOC(=O)NH(CH₂)_n-, -C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_nmOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-,
 15 (O(CH₂)_nmNHC(=O)(CH₂)_n-, -O(C(R⁴)₂)_nmNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,

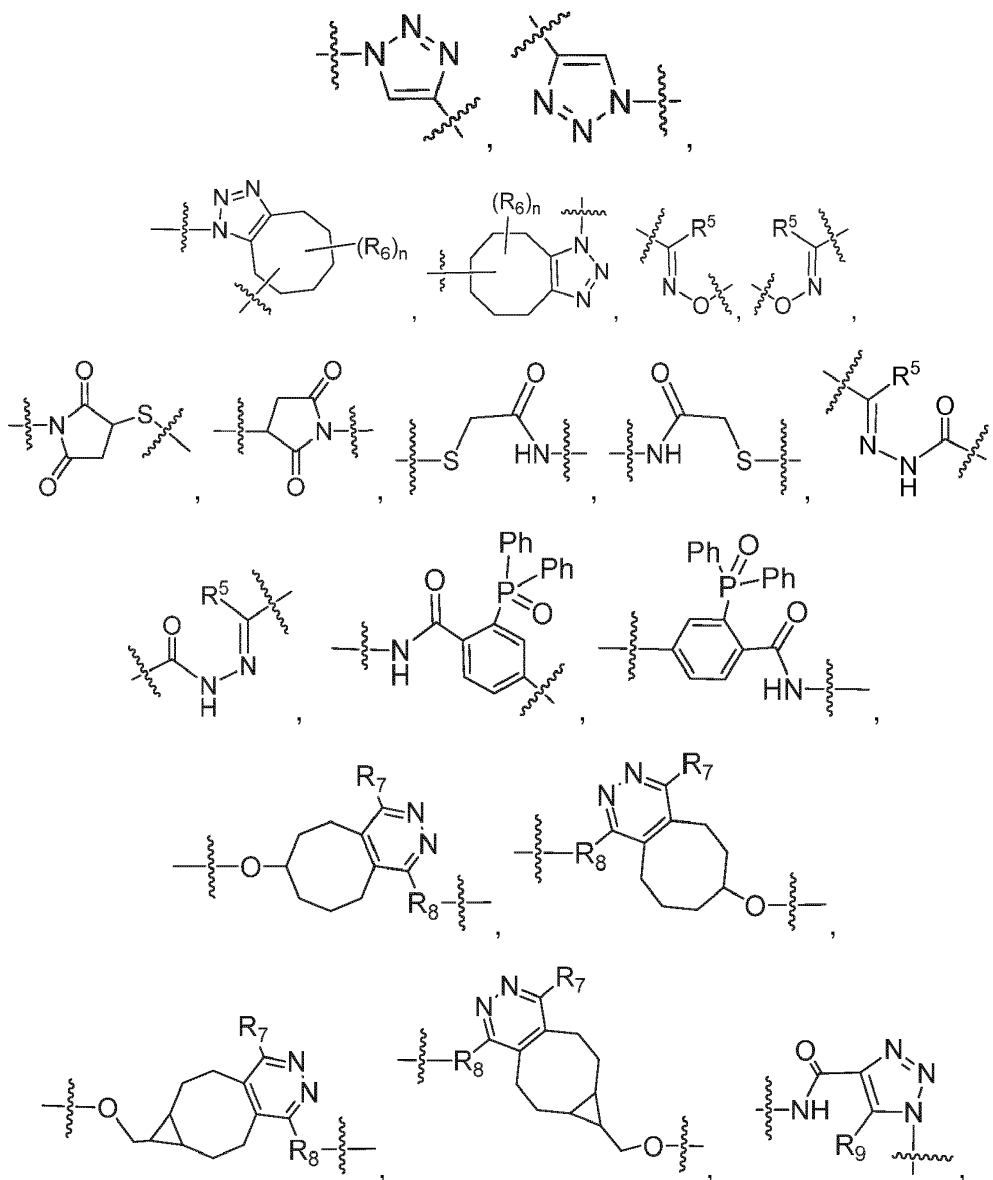


A₃ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -O(CH₂)_nm-, -O(C(R⁴)₂)_nm-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-,
 -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -CH₂)_nC(=O)NH-, -C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -CH₂)_nNHC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -CH₂)_nS-, -C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-,
 -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 -CH₂)_nC(=O)-, -C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -CH₂)_n(O(CH₂)_nmNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_nmNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 -CH₂)_n(O(CH₂)_nmOC(=O)NH(CH₂)_n-, -C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_nmOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -CH₂)_n(O(CH₂)_nmOC(=O)-,
 (C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_nmOC(=O)-, -CH₂)_n(O(CH₂)_nmC(=O)-, -C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_nmC(=O)-, -CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -O(CH₂)_nmNHC(=O)(CH₂)_n-, -CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-,
 25 (O(C(R⁴)₂)_nmNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 30 (O(C(R⁴)₂)_nmNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

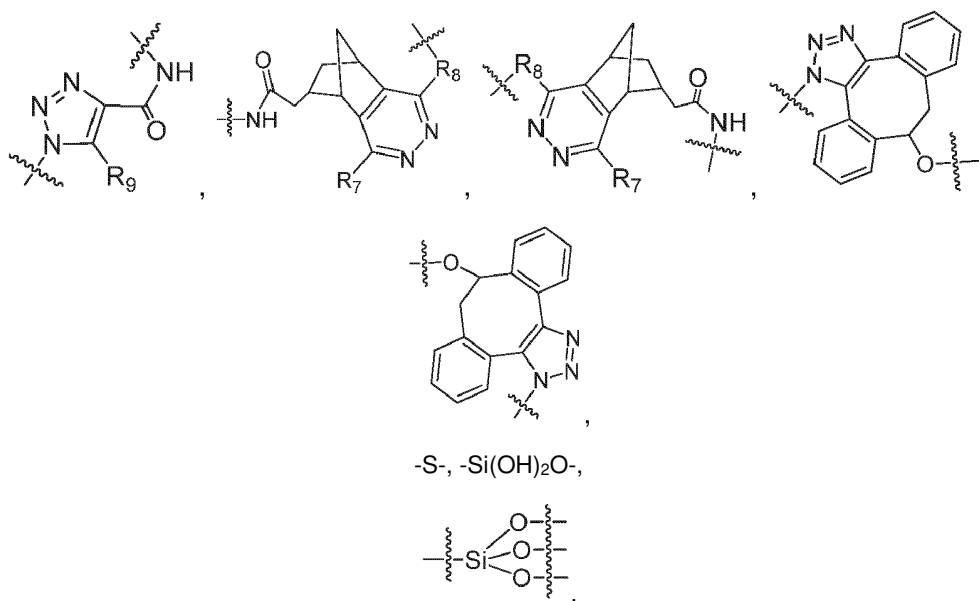


A4 es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)^m-, -(O(C(R⁴h)_n)^m-, -((CH₂)_nO)^m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)^m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

10 cada X^2 se selecciona independientemente de un enlace.



15



5 -CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH- y -NHC(=O)-;

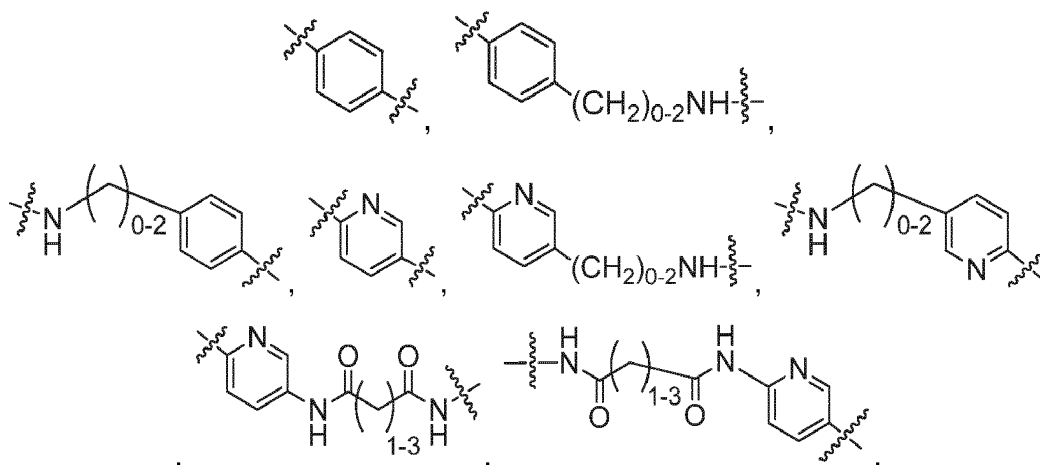
cada R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, -C(=O)OH y -OH,

cada R⁵ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, fenilo o alquilo C₁₋₄ sustituido con 1 a 3 grupos OH;

cada R⁶ se selecciona independientemente de H, flúor, benciloxi sustituido con -C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

10 R⁷ se selecciona independientemente de H, fenilo y piridina;

R⁸ se selecciona independientemente de



15 R⁹ se selecciona independientemente de H y haloalquilo C₁₋₆;

cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y

cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9,

en donde el grupo terminal es una unidad estructural seleccionada de un agente antiinflamatorio, un agente contra el cáncer, un agente antifúngico, un agente antibacteriano, un agente antiparasitario, un agente antiviral, un agente anestésico, un inhibidor de V-ATPasa, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTor, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, un maitansinoide, un MetAP (metionina aminopeptidasa), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, un inhibidor de las reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de la CDK2, un inhibidor de la CDK9, un inhibidor de la Eg5, un inhibidor de la HDAC, un agente dañino para el ADN, un agente alquilante del ADN, un intercalador de ADN, un ligante del surco menor del ADN, un

inhibidor de proteasoma, un inhibidor de ARN polimerasa y un inhibidor de DHFR; o en donde el grupo terminal se selecciona entre un fluoróforo, un cromóforo, un punto cuántico, una sonda magnética, una sonda radioactiva, un reactivo de formación de imágenes, un reactivo de contraste o una sonda de afinidad.

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de los inmunoconjugados de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere al anticuerpo modificado de la invención o al fragmento de unión a antígeno del mismo o a la composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de los inmunoconjugados de la invención para uso como un medicamento.

10 La presente invención se refiere al anticuerpo modificado de la invención o al fragmento de unión a antígeno del mismo o a los inmunoconjugados de la invención para uso en el tratamiento del cáncer, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad infecciosa.

La presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados de la invención, y células huésped que comprenden tales ácidos nucleicos.

15 La presente invención proporciona un método para producir los inmunoconjugados de la invención que comprende

(a) incubar en condiciones adecuadas el anticuerpo modificado de la invención o el fragmento de unión a antígeno del mismo, una 4'-fosfopanteteinil transferasa, y un grupo terminal unido a CoA o un grupo terminal unido a un análogo de CoA, promoviendo así la formación del inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y el grupo terminal unidos entre sí por un enlazador que comprende una 4'-fosfopanteteína o un análogo de 4'-fosfopanteteína;

20 análogo de 4'-fosfopanteteína;

b)

i) incubar en condiciones adecuadas un anticuerpo de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo con una 4'-fosfopanteteinil transferasa y un CoA o un análogo de CoA, uniendo así una 4'-fosfopanteteína o una 4'-fosfopanteteína análogo al anticuerpo o antígeno unión fragmento del mismo, en donde la 4'-fosfopanteteína y el análogo de la 4'-fosfopanteteína comprenden un grupo funcional, y

25 análogo de la 4'-fosfopanteteína comprenden un grupo funcional, y

ii) hacer reaccionar la 4'-fosfopanteteína o el análogo de 4'-fosfopanteteína con un grupo reactivo opcionalmente unido a un grupo terminal, formando así el inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y el grupo terminal unido entre sí por un enlazador que comprende una 4'-fosfopanteteína o un análogo de 4'-fosfopanteteína; o

30 c)

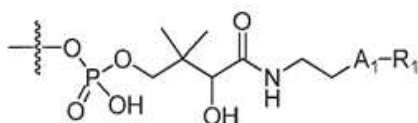
i) incubar en condiciones adecuadas un anticuerpo de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo con una 4'-fosfopanteteinil transferasa y un CoA o un análogo de CoA, uniendo así una 4'-fosfopanteteína o una 4'-fosfopanteteína análogo al anticuerpo o antígeno unión fragmento del mismo, en donde la 4'-fosfopanteteína y el análogo de 4'-fosfopanteteína comprenden un grupo funcional protegido;

35 ii) desproteger el grupo funcional protegido de la 4'-fosfopanteteína o el análogo de la 4'-fosfopanteteína, y

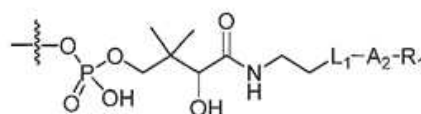
iii) hacer reaccionar el grupo funcional desprotegido de la 4'-fosfopanteteína o el análogo de 4'-fosfopanteteína con un grupo reactivo opcionalmente unido a un grupo terminal, formando así el inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y el grupo terminal unido juntos por un enlazador que comprende una 4'-fosfopanteteína o un análogo de 4'-fosfopanteteína; en donde dichas condiciones adecuadas comprenden una temperatura entre 4°C a 37°C y pH 6.5 a pH 9.0.

40 comprenden una temperatura entre 4°C a 37°C y pH 6.5 a pH 9.0.

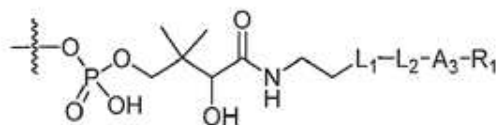
La presente invención proporciona un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo modificado de la invención o el fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde un residuo de serina de la etiqueta peptídica en dicho anticuerpo modificado o fragmento de unión al antígeno del mismo se conjuga con un grupo 4'-fosfopanteteína que tiene la estructura de Fórmula (D-a), Fórmula (E-a), Fórmula (F-a) o Fórmula (G-a):



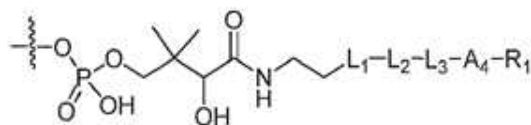
Fórmula (D-a)



Fórmula (E-a)



Fórmula (F-a)



Fórmula (G-a)

en donde:

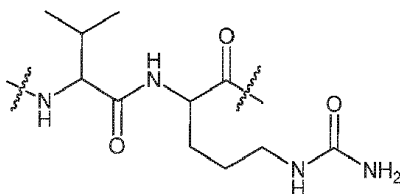
L₁ es -A₁X²⁻ o -X²⁻;

L₂ es un enlace, -A₂-, o -A₂X²⁻;

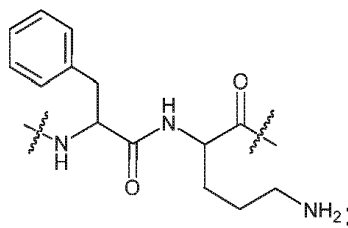
5 L₃ es un enlace, -A₃-, o -A₃X²⁻;

A₁ es -C(=O)NH-, -NHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -
 10 (((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -(CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -
 C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, o-
 (O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

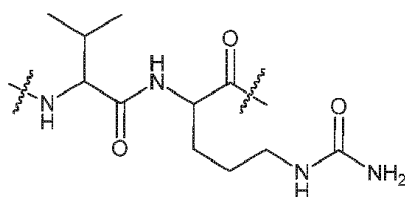
A₂ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -
 15 ((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nS-, -(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH-, -(C(R⁴)₂)_nNH-, -
 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 20 (CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)NH(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-,
 (O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;



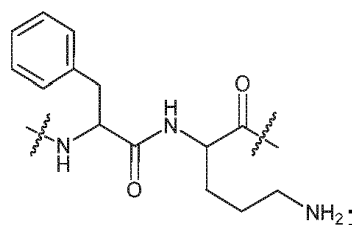
o



A₃ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -
 25 ((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nS-, -(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-,
 30 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)NH(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mC(=O)-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

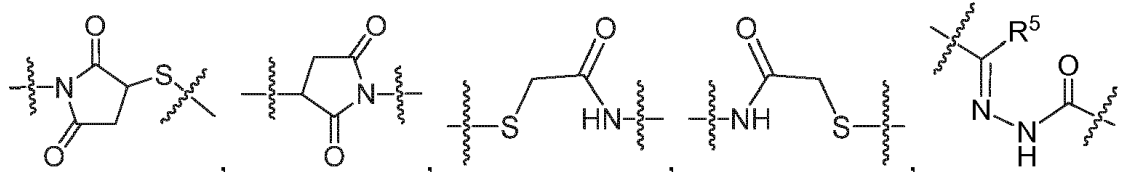
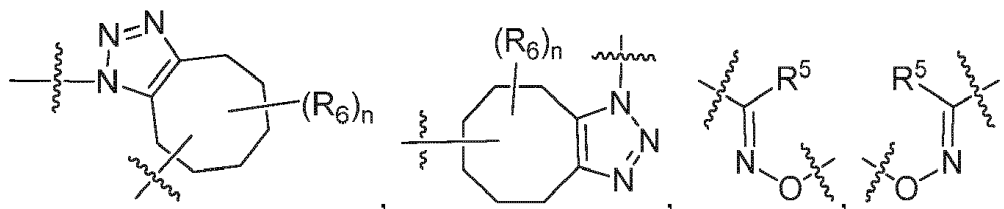
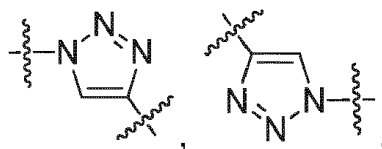


0

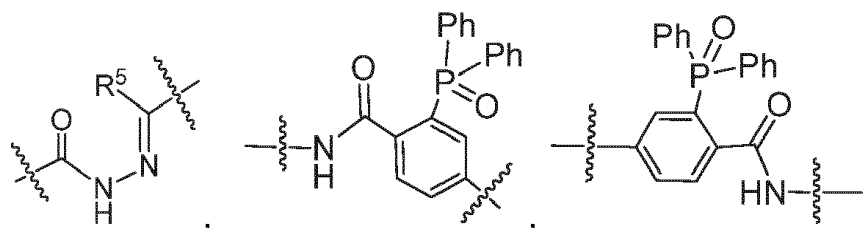


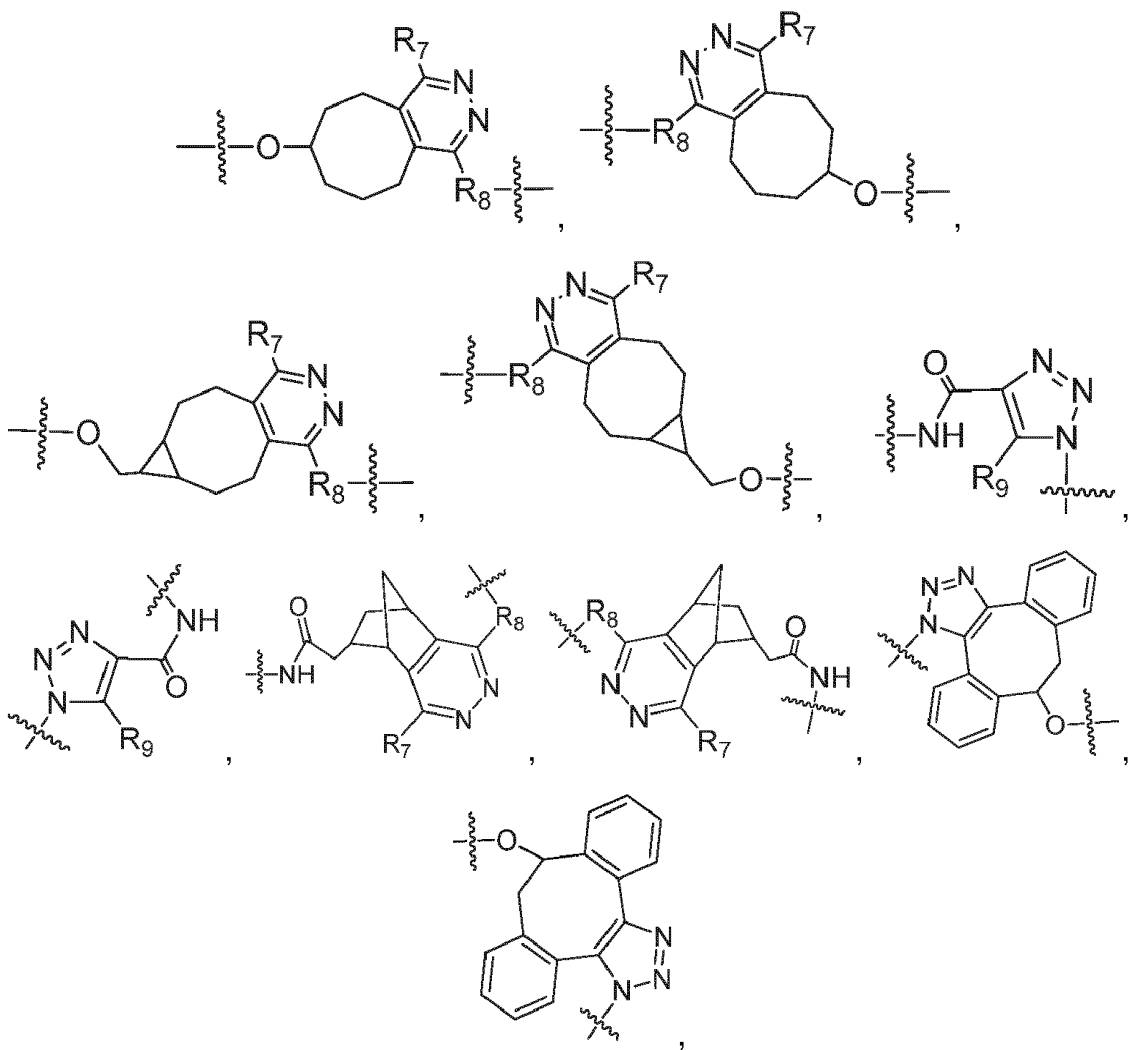
- 5 A₄ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -
 ((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -
 C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 10 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, o-
 (O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

cada X² se selecciona independientemente de un enlace,

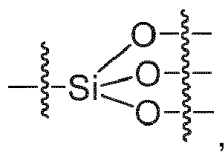


15





-S-, -Si(OH)₂O-,


$$-\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{NH}-, -\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})-, -\text{C}(=\text{O})\text{NH}- \text{ y } -\text{NHC}(=\text{O})-;$$

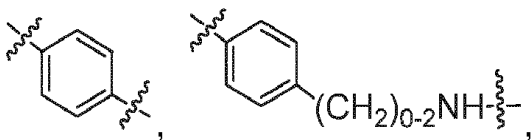
cada R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, -C(=O)OH y -OH,

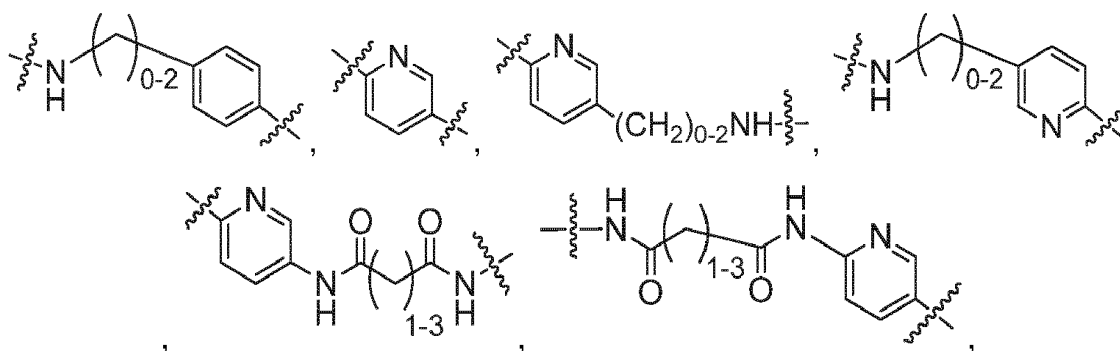
cada R⁵ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, fenilo o alquilo C₁₋₄ sustituido con 1 a 3 grupos OH;

10 cada R⁶ se selecciona independientemente de H, flúor, benciloxi sustituido con -C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

R⁷ se selecciona independientemente de H, fenilo y piridina;

R^8 se selecciona independientemente de





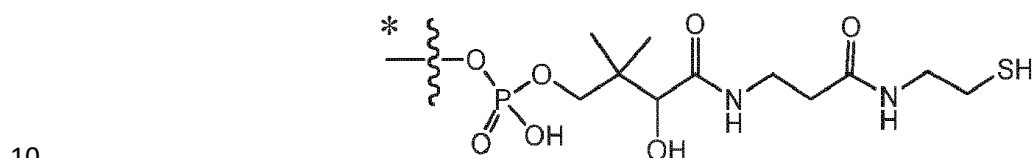
R⁹ se selecciona independientemente de H y haloalquilo C₁₋₆;

cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9,

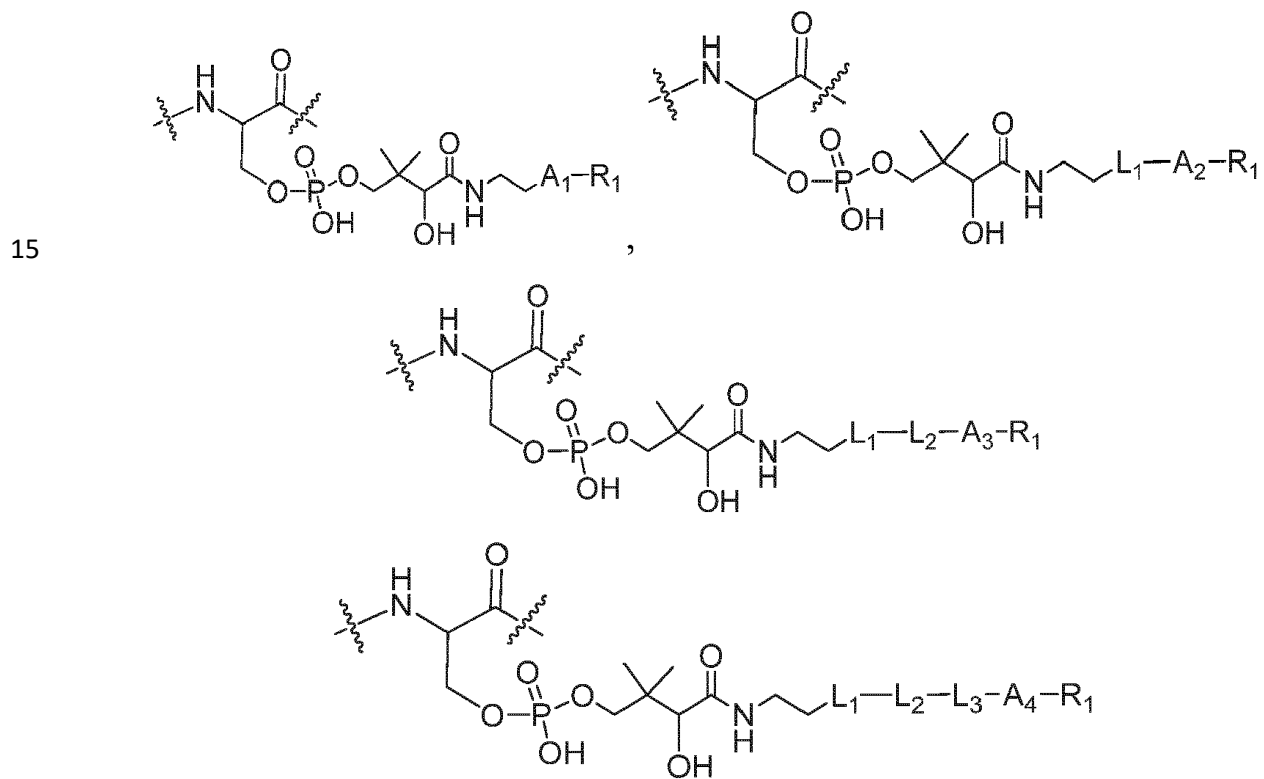
5 cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y

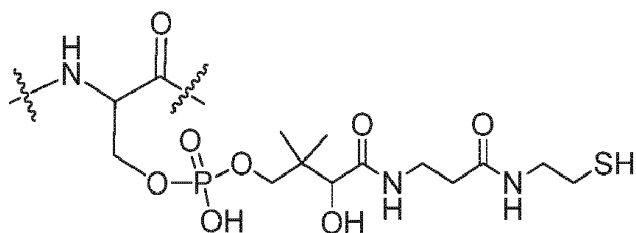
R¹ es un tiol, una maleimida, una haloacetamida, un alquino, una triaril fosfina, un cicloocteno, un oxanobornadieno, una azida, una diaril tetrazina, un norborneno, una monoaril tetrazina, una hidroxilamina, una hidrazina, NH₂-NH-C(=O)-, un aldehído o una cetona.

La presente invención proporciona además inmunoconjugados en los que el grupo 4'-fosfopanteteína es



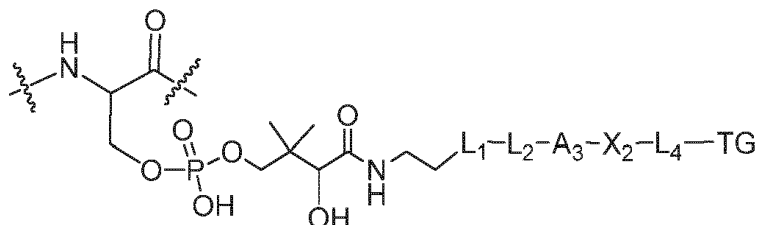
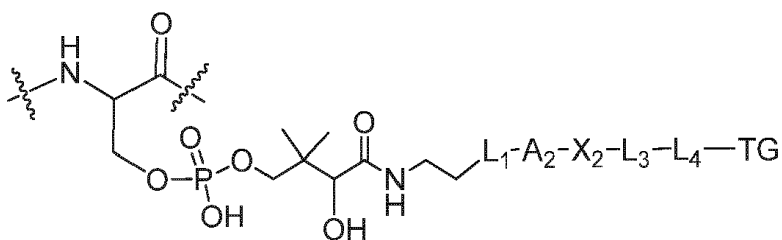
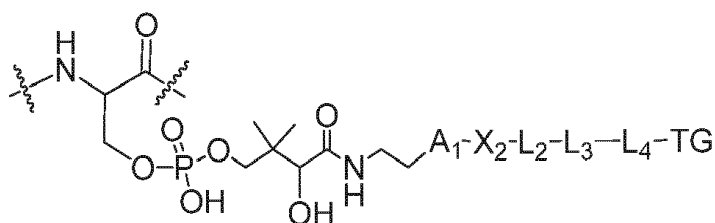
En una realización, la invención se refiere a inmunoconjugados en los que un residuo de serina de la etiqueta peptídica en dicho anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo se conjuga con un grupo 4'-fosfopanteteína que tiene la estructura de Fórmula (D-a), Fórmula (E-a), Fórmula (F-a) o Fórmula (G-a), y en donde la serina conjugada tiene una estructura seleccionada de:



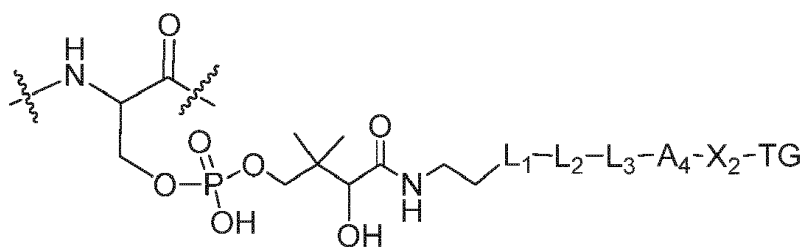


En una realización, el immunoconjugado de la invención comprende un anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde un residuo de serina de la etiqueta peptídica en dicho anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo se conjuga con un grupo 4'-fosfopanteteína modificado y tiene una estructura seleccionada desde:

5



y



10

en donde

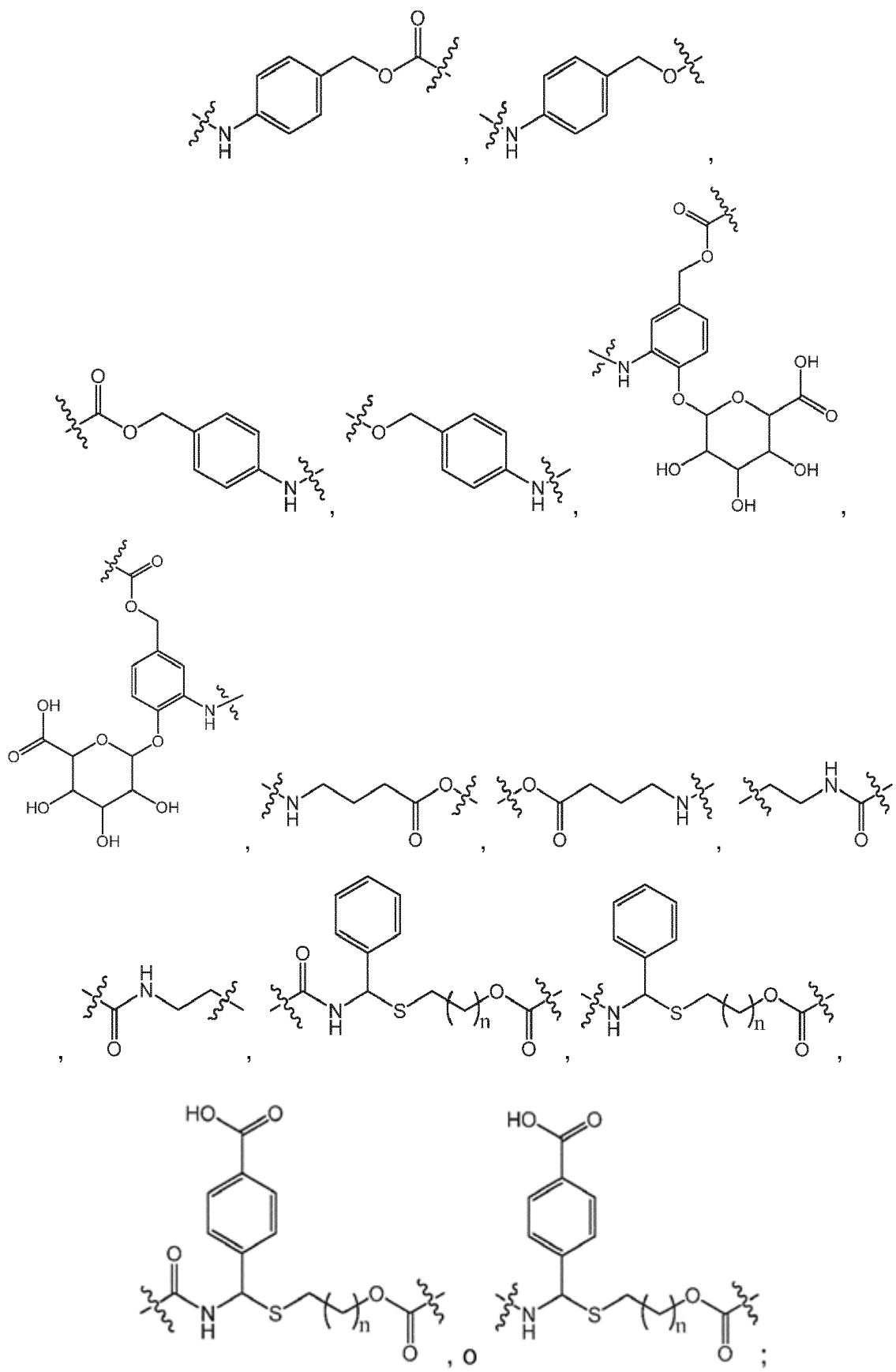
L₁ es -A₁X²- o -X²-;

L₂ es un enlace, -A₂-, o -A₂X²-;

L₃ es un enlace, -A₃-, o -A₃X²-;

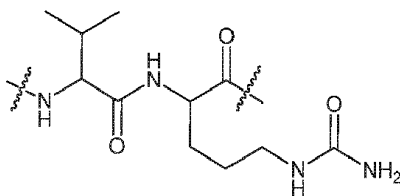
15

L₄ es un enlace, -A₄-, -A₄X²-,

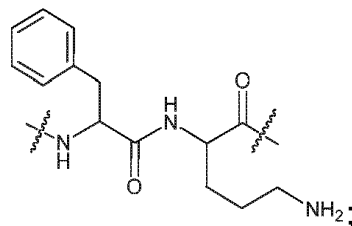


A₁ es -C(=O)NH-, -NHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -
 (((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -
 5 C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -
 (O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

A₂ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -
 ((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NR⁴-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nS-, -(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH-, -
 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 10 (CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)NH(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 15 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-,
 (O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;



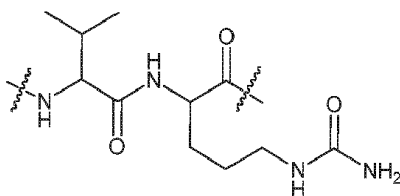
o



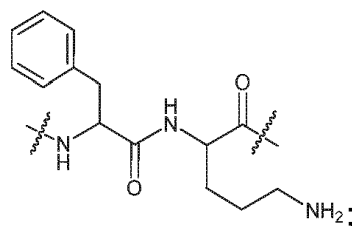
20

A₃ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-,
 -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nS-, -(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-,
 25 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)NH(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_nOC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mC(=O)-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

25



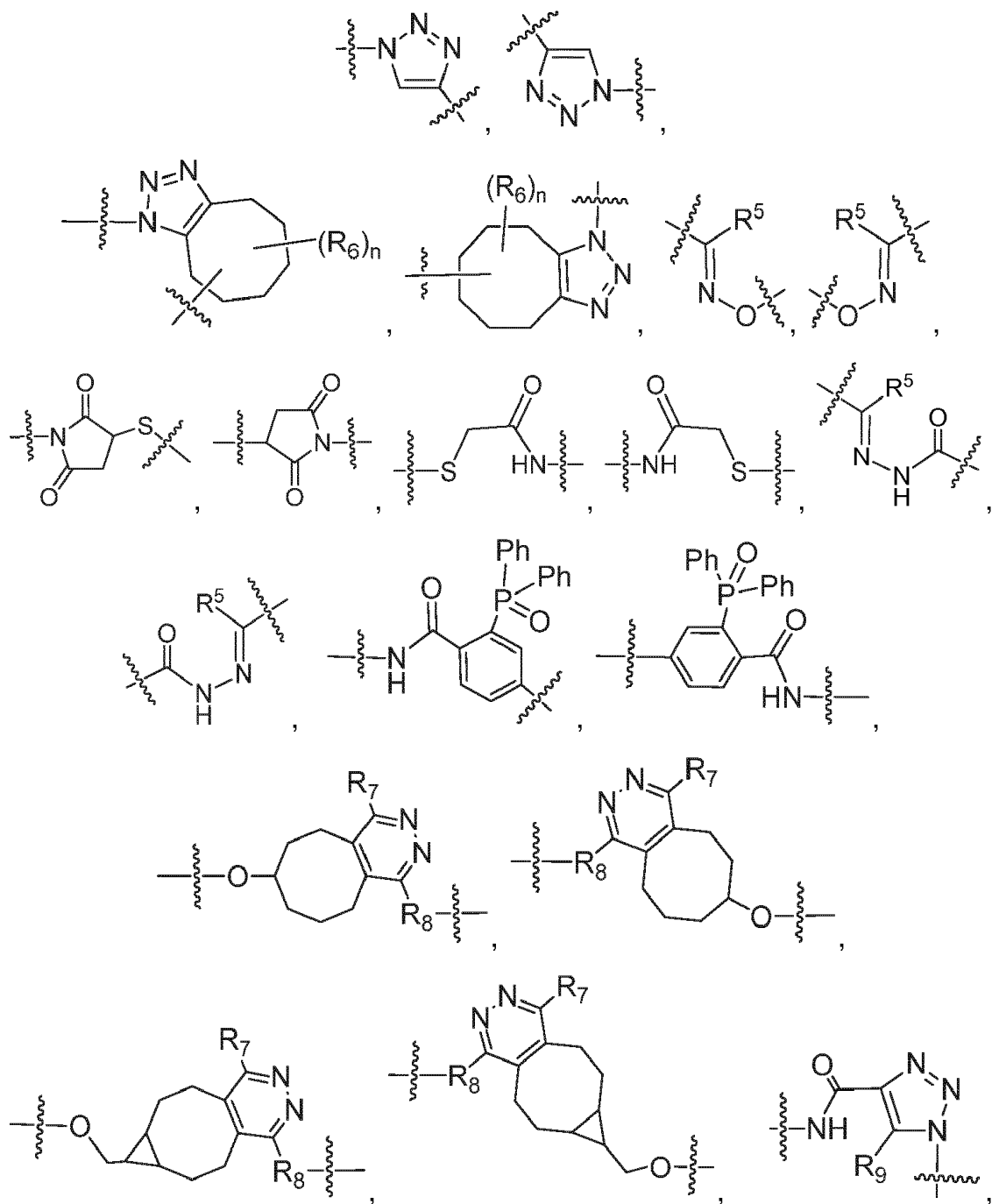
o

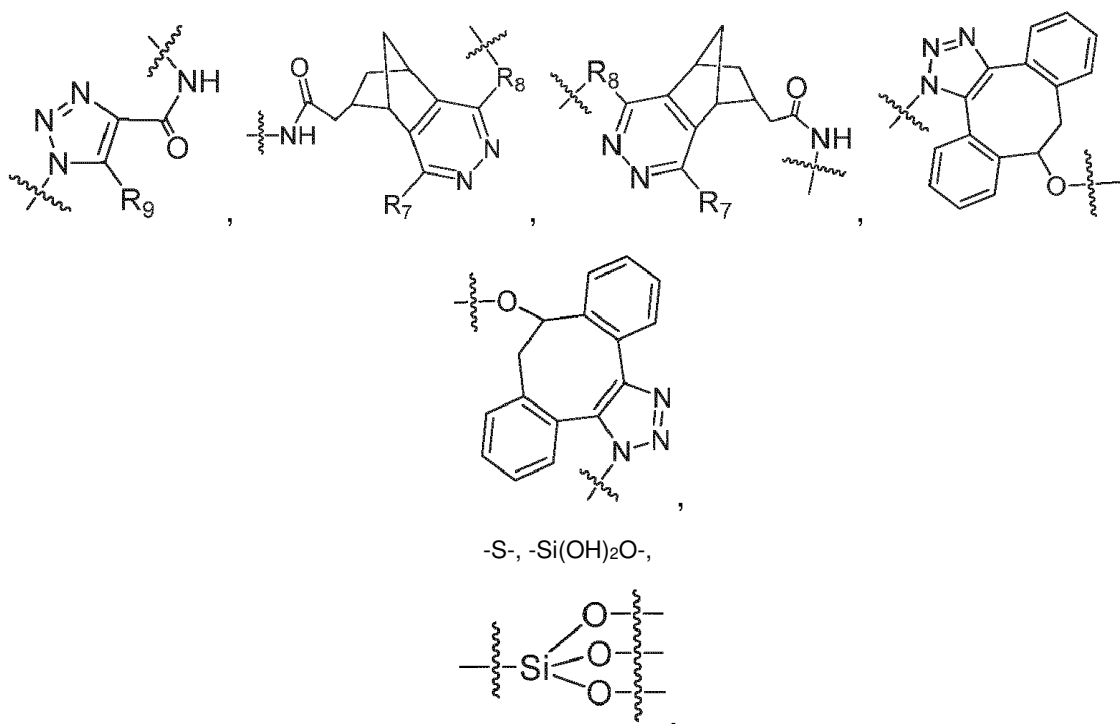


30

A4 es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_nO(CH₂)_nmNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nO(C(R⁴)₂)_nmNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-;

cada X^2 se selecciona independientemente de un enlace,





5 -CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH- y -NHC(=O)-;

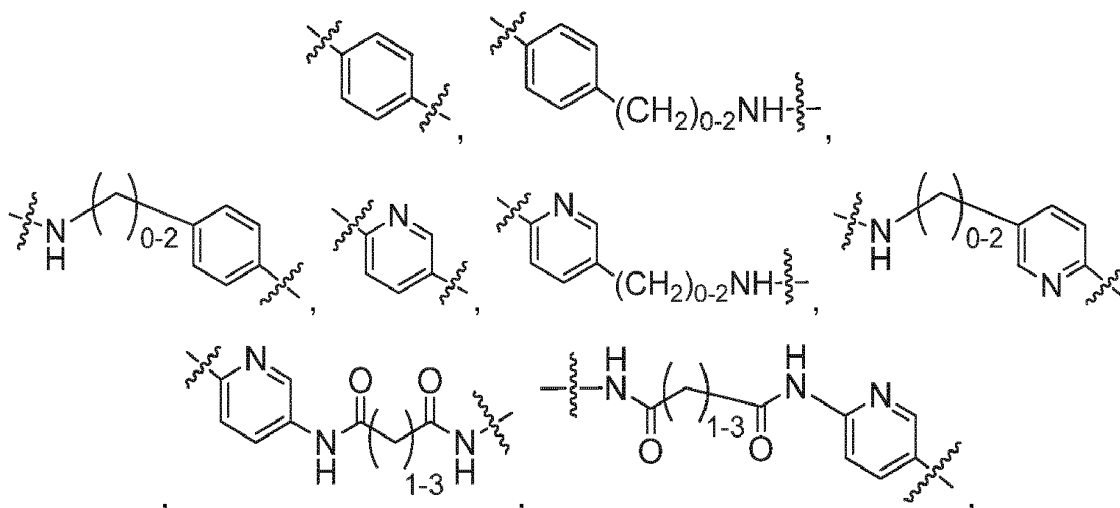
cada R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, -C(=O)OH y -OH,

cada R⁵ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, fenilo o alquilo C₁₋₄ sustituido con 1 a 3 grupos -OH;

cada R⁶ se selecciona independientemente de H, flúor, benciloxi sustituido con -C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

10 R⁷ se selecciona independientemente de H, fenilo y piridina;

R⁸ se selecciona independientemente de



15 R⁹ se selecciona independientemente de H y haloalquilo C₁₋₆;

cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9,

cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y

TG es un grupo farmacológico, una sonda de afinidad, un quelante, una sonda espectroscópica, una sonda radioactiva, un reactivo de generación de imágenes, una molécula lipídica, un polietilenglicol, un polímero, una nanopartícula, un punto cuántico, un liposoma, una partícula de PLGA, un polisacárido, un grupo acetilo o una superficie.

Definiciones

5 Los términos "alquenilo" o "alqueno", como se usan en este documento, se refieren a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los átomos orientados sobre el doble enlace están en la conformación cis (Z) o trans (E). Como se usa en el presente documento, los términos "alquenilo C₂-C₄", "alquenilo C₂-C₅", "alquenilo C₂-C₆", "alquenilo C₂-C₇", "alquenilo C₂-C₈", "alqueno C₂-C₄", "alqueno C₂-C₅", "alqueno C₂-C₆", "alqueno C₂-C₇" y "alqueno C₂-C₈" se refieren a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono y que contiene al menos 2, y como máximo 4, 5, 6, 7 o 8 átomos de carbono, respectivamente. Ejemplos no limitantes de grupos alquenilo, como se usan en este documento, incluyen etenilo, etano, epropenilo, propeno, alilo (2-propenilo), 2-propeno, butenilo, pentenilo, penteno, hexenilo, heptenilo, hepteno, octenilo, nonenilo, noneno, decenilo, deceno y similares. Si no se especifica lo contrario, un grupo alquenilo generalmente es un alquenilo C₂-C₆.

15 Los términos "alquinilo" o "alquino", como se usan en este documento, se refieren a un radical de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Como se usa en el presente documento, los términos "alquinilo C₂-C₄", "alquinilo C₂-C₅", "alquinilo C₂-C₆", "alquinilo C₂-C₇" y "alquinilo C₂-C₈" se refieren a un radical de hidrocarburo de cadena ramificada o recta que tiene al menos triple enlace de carbono-carbono y que contiene al menos 2 y como máximo 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono, respectivamente. Ejemplos no limitantes de grupos alquinilo, como se usan en este documento, incluyen etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, heptinilo, octinilo, noninilo, decinilo y similares. Si no se especifica lo contrario, un grupo alquinilo generalmente es un alquinilo C₂-C₆.

25 El término "alquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada saturada. Tal como se usa en el presente documento, los términos "alquilo C₁-C₃", "alquilo C₁-C₄", "alquilo C₁-C₅", "alquilo C₁-C₆", "alquilo C₁-C₇" o "alquilo C₁-C₈" se refieren a hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene al menos 1, y como máximo 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono, respectivamente. Ejemplos no limitantes de grupos alquilo como se usan en este documento incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo y similares. Si no se especifica lo contrario, un grupo alquilo generalmente es un alquilo C₁-C₆.

30 El término "alcoxi", como se usa en el presente documento, se refiere al grupo -OR_a, donde R_a es un grupo alquilo como se define en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, los términos "alcoxi C₁-C₃", "alcoxi C₁-C₄", "alcoxi C₁-C₅", "alcoxi C₁-C₆", "alcoxi C₁-C₇" y "alcoxi C₁-C₈" se refieren a un grupo alcoxi en donde la unidad estructural alquilo contiene al menos 1, y como máximo 3, 4, 5, 6, 7 u 8, átomos de carbono. Ejemplos no limitantes de grupos alcoxi, como se usan en este documento, incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butiloxi, t-butiloxi, pentiloxi, hexiloxi, heptiloxi, octiloxi, noniloxi, deciloxi y similares.

40 El término "arilo", como se usa en el presente documento, se refiere a sistemas de anillos monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos que tienen un total de seis a catorce miembros de anillo, en donde al menos un anillo en el sistema es aromático. Un grupo arilo también incluye uno o más anillos aromáticos fusionados a uno o más anillos de hidrocarburos no aromáticos. Ejemplos no limitantes de grupos arilo, como se usan en este documento, incluyen fenilo (Ph), naftilo, fluorenilo, indenilo, azulenilo, antracenilo y similares. Un grupo arilo puede contener uno o más sustituyentes y, por lo tanto, puede estar "opcionalmente sustituido". A menos que se especifique lo contrario, los grupos arilo pueden tener hasta cuatro sustituyentes.

45 El término "cicloalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de anillo monocíclico, bicíclico fusionado, tricíclico fusionado o policíclico puenteado. Como se usa en el presente documento, los términos "cicloalquilo C₃-C₅", "cicloalquilo C₃-C₆", "cicloalquilo C₃-C₇", "cicloalquilo C₃-C₈", "cicloalquilo C₃-C₉", y "cicloalquilo C₃-C₁₀" se refieren a un conjunto de anillo monocíclico, bicíclico fusionado, tricíclico fusionado o policíclico puenteado que contiene al menos 3, y como máximo 5, 6, 7, 8, 9 o 10, átomos de carbono. Ejemplos no limitantes de grupos cicloalquilo, como se usan en este documento, incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclodecilo, decahidronaftalenilo y similares. Si no se especifica lo contrario, un grupo cicloalquilo generalmente es un cicloalquilo C₃-C₈.

50 Los términos "cicloalquenilo" o "cicloalqueno", como se usan en este documento, se refieren a un conjunto de anillo monocíclico, bicíclico fusionado, tricíclico fusionado o policíclico puenteado que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los átomos orientados sobre el doble enlace están en la conformación cis (Z) o trans (E). Un cicloalqueno monocíclico se puede fusionar con uno o dos anillos arilo. Ejemplos no limitantes de grupos cicloalquenilo, como se usan en este documento, incluyen ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclooctenilo, ciclononenilo, ciclodecenilo y similares. Si no se especifica lo contrario, un grupo cicloalquenilo generalmente es un cicloalquenilo C₅-C₈.

Los términos "cicloalquinilo" o "cicloalquino", como se usan en este documento, se refieren a un conjunto de anillo monocíclico, bicíclico fusionado, tricíclico fusionado o policíclico puenteado que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Un cicloalquino monocíclico se puede fusionar con uno o dos anillos arilo. Ejemplos no limitantes de grupos cicloalquinilo, como se usan en este documento, incluyen ciclopropinilo, ciclobutinilo, ciclopentinilo, ciclohexinilo, cicloheptinilo, ciclooctinilo, ciclononinilo, ciclodecinilo y similares. Si no se especifica lo contrario, un grupo cicloalquinilo generalmente es un cicloalquinilo C₆-C₈.

El término "heteroarilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo monocíclico heteroaromático de 5-6 miembros que tiene 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de entre nitrógeno, oxígeno y azufre, un anillo bicíclico fusionado de 8-10 miembros que tiene 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de entre nitrógeno, oxígeno y azufre como miembros del anillo y cuando al menos uno de los anillos es aromático, o un anillo tricíclico fusionado de 12 a 14 miembros que tiene 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de entre nitrógeno, oxígeno y azufre y donde al menos uno de los anillos es aromático. Tales sistemas de anillos tricíclicos y bicíclicos fusionados pueden fusionarse con uno o más anillos arilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo. Ejemplos no limitantes de grupos heteroarilo, como se usan en este documento, incluyen 2- o 3-furilo; 1-, 2-, -4 o 5-imidazolilo; 3-, 4- o 5-isotiazolilo; 3-, 4- o 5-isoxazolilo; 2-, 4- o 5-oxazolilo; 4- o 5-1,2,3-oxadiazolilo; 2- o 3-pirazinilo; 1-, 3-, 4- o 5-pirazolilo; 3-, 4-, 5- o 6-piridazinilo; 2-, 3- o 4-piridilo; 2-, 4-, 5- o 6-pirimidinilo; 1-, 2- o 3-pirrolilo; 1- o 5-tetrazolilo; 2- o 5-1,3,4-tiadiazolilo; 2-, 4- o 5-tiazolilo; 2- o 3-tienilo; 2-, 4- o 6-1,3,5-triazinilo; 1-, 3- o 5-1,2,4-triazolilo; 1-, 4- o 5-1,2,3-triazolilo; 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-acridinilo; 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 benzo[g]isoquinolino; 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzoxazolilo; 1-, 2-, 4-, 5-, 6-, o 7-benzimidazolilo; 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-benzotiazolilo; 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-benzoxazolinilo; 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-cinolinilo; 2-, 4- o 5-4H-imidazo[4,5-d]tiazolilo; 2-, 3-, 5- o 6-imidazo[2,1-b]tiazolilo; 2-, 3-, 6- o 7-imidazo[1,2-b][1,2,4]triazinilo; 1-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-indazolilo; 1-, 2-, 3-, 5-, 6-, 7- o 8-indolizínilo; 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-indolilo; 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-isindolilo; 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8-isoquinolilo; 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-naftiridinilo; 1-, 2-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-perimidinilo; 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-fenantridinilo; 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-fenatrolinilo; 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8- o 9-fenazinilo; 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-fenotiazinilo; 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-fenoxazinilo; 1-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-ftalazinilo; 2-, 4-, 6- o 7-pteridinilo; 2-, 6-, 7- o 8-purinilo; 2-, 3-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10- o 11-7H-pirazino[2,3-c]carbazolilo; 2-, 3-, 5-, 6- o 7-furo[3,2-b]piranilo; 1-, 3- o 5-1H-pirazolo[4,3-d]-oxazolilo; 2-, 3-, 5- o 8-pirazino[2,3-d]piridazinilo; 1-, 2-, 3-, 4-, 5- o 8-5H-pirido [2,3-d]-o-oxazinilo; 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8- o 9-quinolizínilo; 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-quinolinilo; 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-quinazolinilo; 2-, 3-, 4- o 5-tieno[2,3-b]furanilo, y 1-, 3-, 6-, 7-, 8- o 9-furo[3,4-c]cinolinilo.

El término "heteroátomos", como se usa en el presente documento, se refiere a átomos de nitrógeno (N), oxígeno (O) o azufre (S).

El término "heterocicloalquilo", como se usa en este documento, se refiere a una estructura de anillo de hidrocarburo monocíclico saturado de 3-8 miembros, una estructura de anillo de hidrocarburo bicíclico fusionado de 6-9 miembros saturado, o una estructura de anillo de hidrocarburo tricíclico condensado saturado de 10-14 miembros, en donde uno a cuatro de los carbonos del anillo de la estructura del anillo hidrocarbonado se reemplazan por uno a cuatro grupos seleccionados independientemente entre -O-, -NR- y -S-, en donde R es hidrógeno, alquilo C₁-C₄ o un grupo protector de amino. Ejemplos no limitantes de grupos heterocicloalquilo, como se usan en este documento, incluyen aziridinilo, aziridin-1-ilo, aziridin-2-ilo, aziridin-3-ilo, oxiranilo, oxiran-2-ilo, oxiran-3-ilo, tiiranilo, tiiran-2-ilo, tiiran-3-ilo, azetadinilo, azetadin-1-ilo, azetadin-2-ilo, azetadin-3-ilo, oxetanilo, oxetan-2-ilo, oxetan-3-ilo, oxetan-4-ilo, tietanilo, tietan-2-ilo, tietan-3-ilo, tietan-4-ilo, pirrolidinilo, pirrolidin-1-ilo, pirrolidin-2-ilo, pirrolidin-3-ilo, pirrolidin-4-ilo, pirrolidin-5-ilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrofuran-4-ilo, tetrahidrofuran-5-ilo, tetrahidrotienilo, tetrahidrotieno, tetrahidrotieno-2-ilo, tetrahidrotieno-3-ilo, tetrahidrotieno-4-ilo tetrahidrotieno-5-ilo, piperidinilo, piperidin-1-ilo, piperidin-2-ilo, piperidin-3-ilo, piperidin-4-ilo, piperidin-5-ilo, piperidin-6-ilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiran-2-ilo, tetrahidropiran-3-ilo, tetrahidropiran-4-ilo, tetrahidropiran-5-ilo, tetrahidropiran-6-ilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidrotiopiran-2-ilo, tetrahidrotiopiran-3-ilo, tetrahidrotiopiran-4-ilo, tetrahidrotiopiran-5-ilo, tetrahidrotiopiran-6-ilo, piperazinilo, piperazin-1-ilo, piperazin-2-ilo, piperazin-3-ilo, piperazin-4-ilo, piperazin-5-ilo, piperazin-6-ilo, morfolinilo, morfolin-2-ilo, morfolin-3-ilo, morfolin-4-ilo, morfolin-5-ilo, morfolin-6-ilo, tiomorfolinilo, tiomorfolin-2-ilo, tiomorfolin-3-ilo, tiomorfolin-4-ilo, tiomorfolin-5-ilo, tiomorfolin-6-ilo, oxatianilo, oxatian-2-ilo, oxatian-3-ilo, oxatian-5-ilo, oxatian-6-ilo, ditianilo, ditian-2-ilo, ditian-3-ilo, ditian-5-ilo, ditian-6-ilo, azepanilo, azepan-1-ilo, azepan-2-ilo, azepan-3-ilo, azepan-4-ilo, azepan-5-ilo, azepan-6-ilo, azepan-7-ilo, oxepanilo, oxepan-2-ilo, oxepan-3-ilo, oxepan-4-ilo, oxepan-5-ilo, oxepan-6-ilo, oxepan-7-ilo, tiepanilo, tiepan-2-ilo, tiepan-3-ilo, tiepan-4-ilo, tiepan-5-ilo, tiepan-6-ilo, tiepan-7-ilo, dioxolanilo, dioxolan-2-ilo, dioxolan-4-ilo, dioxolan-5-ilo, tioxanilo, tioxan-2-ilo, tioxan-3-ilo, tioxan-4-ilo, tioxan-5-ilo, ditiolanilo, ditiolan-2-ilo, ditiolan-4-ilo, ditiolan-5-ilo, pirrolinilo, pirrolin-1-ilo, pirrolin-2-ilo, pirrolin-3-ilo, pirrolin-4-ilo, pirrolin-5-ilo, imidazolinilo, imidazolin-1-ilo, imidazolin-3-ilo, imidazolin-4-ilo, imidazolin-5-ilo, imidazolidinilo, imidazolidin-1-ilo, imidazolidin-2-ilo, imidazolidin-3-ilo, imidazolidin-4-ilo, imidazolidin-5-ilo, pirazolinilo, pirazolin-1-ilo, pirazolin-3-ilo, pirazolin-4-ilo, pirazolin-5-ilo, pirazolidinilo, pirazolidin-1-ilo, pirazolidin-2-ilo, pirazolidin-3-ilo, pirazolidin-4-ilo, pirazolidin-5-ilo, hexahidro-1,4-diazepinilo, dihidrofuranildihidropiranilo, 1,2,3,6-tetrahidropiridinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofuranilo, 3-azabicyclo[3.1.0]hexanilo, 3-azabicyclo[4.1.0]heptanilo, pirrolidinil-2-ona, piperidinil-3-ona piperidinil-2-ona, piperidinil-4-ona y 2H-pirrolilo.

El término "opcionalmente sustituido", como se usa en este documento, significa que el grupo referenciado puede o no estar sustituido con uno o más grupo(s) adicional(es) en lugar de uno o más átomos de hidrógeno del grupo no sustituido. El número de tales grupos que pueden estar presentes varía desde uno hasta el número de átomos de

hidrógeno en el grupo no sustituido. Los sustituyentes opcionales, a menos que se especifique lo contrario, se seleccionan individual e independientemente entre alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterocicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, mercaptilo, ciano, halo, carbonilo, tiocarbonilo, isocianato, tiocianato, isotiocianato, nitro, perhaloalquilo, perfluoroalquilo y amino, incluidos los grupos amino mono y disustituidos, y los derivados protegidos de los mismos. Ejemplos no limitantes de sustituyentes opcionales incluyen, halo (particularmente F, Cl y Br), -CN, -OR, -R, -NO₂, -C(=O)R, -OC(=O)R, -C(=O)OR, -OC(=O)NHR, -C(=O)N(R)₂, -SR-, -S(=O)R, -S(=O)₂R, -NHR, -N(R)₂, -NHC(=O)R, -NRC(=O)R, -NRC(S)R, NHC(=O)OR, -NRCO₂R, -NRC(=O)N(R)₂, -NRC(S)N(R)₂, -NRNRC(=O)R, -NRNRC(=O)N(R)₂, -NRNRCO₂R, -C(=O)NH-, S(=O)₂NHR, -S(=O)₂N(R)₂, -NHS(=O)₂, -NHS(=O)₂R, -C(=O)C(=O)R, -C(=O)CH₂C(=O)R, -C(S)R, -C(=O)N(R)₂, -C(S)N(R)₂, -OC(=O)N(R)₂, -C(O)N(OR)R, -C(NOR)R, -S(=O)₃R, -NRSO₂N(R)₂, -NRSO₂R, -N(OR)R, -C(=NH)-N(R)₂, -P(=O)₂R, -PO(R)₂, -OPO(R)₂, - (CH₂)₀₋₂NHC(=O)R, fenilo (Ph) opcionalmente sustituido con R, -O(Ph) opcionalmente sustituido con R, -(CH₂)₁₋₂(Ph), opcionalmente sustituido con R, -CH=CH(Ph), opcionalmente sustituido con R, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alquilo C₁-C₆ sustituido con halógeno, alcoxi C₁-C₆ sustituido con halógeno, donde cada R se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, alcoxi C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, alquilo C₁-C₆ sustituido con halógeno, alcoxi C₁-C₆ sustituido con halógeno; y dos grupos R en el mismo o en átomos conectados adyacentes se pueden tomar juntos para formar un anillo de 5-6 miembros que opcionalmente contiene un N, O o S adicional como un miembro del anillo. Los sustituyentes adecuados para los grupos alquilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo pueden incluir además =CHR, =O (oxo) y =N-R. Los sustituyentes preferidos para un grupo arilo o heteroarilo se seleccionan entre F, Cl, Br, CN, -NR'₂, hidroxilo, alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄, haloalcoxi C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄, alquilo C₁-C₄, -COOR', -CONR'₂, -SR' y -SO₂R', donde cada R' es H o alquilo C₁-C₄. Los sustituyentes preferidos para un grupo alquilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo se seleccionan entre oxo (=O), F, Cl, Br, CN, -NR'₂, hidroxilo, alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄, haloalcoxi C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄ alquilo C₁-C₄, -COOR', -CONR'₂, -SR' y -SO₂R', donde cada R' es H o alquilo C₁-C₄.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural, sintéticos y no naturales, así como a análogos de aminoácidos y a miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los compuestos miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido natural.

El término "aminoácido no natural", como se usa en este documento, pretende representar estructuras de aminoácidos que no se pueden generar biosintéticamente en ningún organismo utilizando genes modificados o no modificados de cualquier organismo, ya sean iguales o diferentes. Además, se entiende que tales "aminoácidos no naturales" requieren un ARNt modificado y una ARNt sintetasa modificada (RS) para su incorporación en una proteína. Estos pares de ARNt/RS ortogonales "seleccionados" son específicos para el aminoácido no natural y se generan mediante un proceso de selección desarrollado por Schultz et al. (véase, por ejemplo, Liu et al., Annu. Rev. Biochem. 79: 413-444, 2010) o un procedimiento similar. El término "aminoácido no natural" no incluye el aminoácido proteinogénico natural pirrolisina 22^a (Pyl), así como su análogo desmetilado pirrolina-carboxi-lisina (Pcl), porque la incorporación de ambos residuos en proteínas está mediada por el par de pirrolisil-ARNt/ARNt sintetasa no modificada de origen natural (véase, por ejemplo, Ou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108: 10437-10442, 2011).

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido de la familia de inmunoglobulinas que es capaz de unirse a un antígeno correspondiente de forma no covalente, reversible y de una manera específica. Por ejemplo, un anticuerpo IgG de origen natural es un tetrámero que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o a factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

El término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de camélidos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-id a los anticuerpos de la invención). Los anticuerpos pueden ser de cualquier

isotipo/clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

Tanto la cadena ligera como la pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de las porciones de la cadena ligera (V_L) y pesada (V_H) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. A la inversa, los dominios constantes de la cadena ligera (C_L) y la cadena pesada (CH_1 , CH_2 o CH_3) confieren importantes propiedades biológicas, como la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión al receptor Fc, la unión al complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida que se vuelven más distales con respecto al sitio de unión al antígeno o al extremo amino del anticuerpo. El extremo N- es una región variable y en el extremo C- es una región constante; Los dominios CH_3 y C_L en realidad comprenden los dominios carboxi-terminales de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

El término "fragmento de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o a un fragmento de unión a no antígeno (por ejemplo, Fc) de un anticuerpo. El término "fragmento de unión a antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a una o más porciones de un anticuerpo que retienen la capacidad de interactuar específicamente con (por ejemplo, mediante la unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un epítipo de un antígeno. Ejemplos de fragmentos de unión incluyen, pero no se limitan a, Fvs de una sola cadena (scFv), Fvs unidos a disulfuro (sdFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y CH_1 ; un fragmento F(ab)2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH_1 ; un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989), que consiste en un dominio V_H ; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR), u otros fragmentos de unión a epítipo de un anticuerpo.

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, se pueden unir, mediante métodos recombinantes, a través de un enlazador sintético que les permite fabricarse como una cadena de proteína única en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla ("scFv"); véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242: 423-426, 1988; y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883, 1988). También se pretende que tales anticuerpos de cadena única estén abarcados dentro del término "fragmento de unión a antígeno". Estos fragmentos de unión a antígeno se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los fragmentos de unión a antígeno también se pueden incorporar en los anticuerpos de un solo dominio, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23: 1126-1136, 2005). Los fragmentos de unión a antígeno pueden injertarse en armazones basados en polipéptidos tales como la fibronectina tipo III (Fn3) (véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,703,199, que describe monocuerpos del polipéptido de fibronectina).

Los fragmentos de unión a antígeno pueden incorporarse en moléculas de cadena única que comprenden un par de segmentos Fv en tándem (V_H - CH_1 - V_H - CH_1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata et al., Protein Eng. 8: 1057-1062, 1995 y US Pat. No. 5,641,870).

El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos, que incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica o se derivan de la misma fuente genética. Este término también incluye preparaciones de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular.

El término "anticuerpo humano", como se usa en este documento, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto el marco como las regiones CDR se derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de tales secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana o anticuerpo que contiene secuencias marco consensuadas derivadas del análisis de secuencias marco humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik et al., J. Mol. Biol. 296: 57-86, 2000).

Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*, o una sustitución conservadora para promover la estabilidad o la fabricación).

El término anticuerpo "humanizado", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que retiene la reactividad de un anticuerpo no humano mientras es menos inmunogénico en los seres humanos. Esto se puede lograr, por ejemplo, reteniendo las regiones CDR no humanas y reemplazando las partes restantes del anticuerpo con sus contrapartes humanas. Véase, por ejemplo, Morrison et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984);

Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44: 65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988); Pade lan, Molec. Immun., 28: 489-498 (1991); Pade lan, Molec. Immun., 31(3): 169-217 (1994).

El término "reconocer" como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que encuentra e interactúa (por ejemplo, se une) con su epítipo, ya sea que ese epítipo sea lineal o conformacional. El término "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Los epítipos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítipos incluyen técnicas del arte, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)).

El término "afinidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la fuerza de la interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos únicos. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del "brazo" del anticuerpo interactúa a través de fuerzas débiles no covalentes con antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, más fuerte es la afinidad.

El término "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un antígeno puede tener reactividad cruzada con otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o productos químicos.

El término "variante modificada de forma conservadora" se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de ácido nucleico. Con respecto a las secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas de manera conservadora se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde se especifica una alanina por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Para las secuencias de polipéptidos, las "variantes modificadas de manera conservadora" incluyen sustituciones individuales, eliminaciones o adiciones a una secuencia de polipéptidos que dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas de manera conservadora son además y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de la invención. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) cisteína (C), metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)). El término "modificaciones de secuencia conservadora" se utiliza para referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

El término "optimizado" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de nucleótidos que se ha alterado para codificar una secuencia de aminoácidos usando codones que son preferidos en la célula u organismo de producción, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de levadura, una célula de *Pichia*, una célula fúngica, una célula de *Trichoderma*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada está diseñada para retener completamente o tanto como sea posible la secuencia de aminoácidos codificada originalmente por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como la secuencia "parental".

Los términos "porcentaje idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, 60% de identidad, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% de identidad sobre una región específica, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia), cuando se compara y alinea para obtener la máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o región designada según lo medido utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineación manual e

inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos), o más preferiblemente sobre una región que es de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y referencia se ingresan en un ordenador, las coordenadas de la subsecuencia se designan, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Se pueden usar los parámetros predeterminados del programa, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencia calcula luego el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en este documento, incluye una referencia a un segmento de cualquiera de las varias posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consta de 20 a 600, generalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en las que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith and Waterman, *Adv. Appl. Mates.* 2:482c (1970), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson and Lipman, *Proc. Natl Acad Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, 2003).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *Nuc. Acidos Res.* 25: 3389-3402, 1977; y Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990, respectivamente. El software para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo involucra primero la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul et al., supra). Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se puede aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada cae en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; el puntaje acumulativo llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntaje negativo; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como predeterminada una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como valor predeterminado una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff and Henikoff, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se produciría por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0.2, más preferiblemente menor que aproximadamente 0.01, y más preferiblemente menor que aproximadamente 0.001.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers and W. Miller, *Comput. Apl. Biosci.* 4: 11-17, 1988) que se incorporó al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de brecha de 12 y una penalización de brecha de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 444-453, 1970, que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250 y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Aparte del porcentaje de identidad de secuencia indicado anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe más adelante. Por lo tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren solo por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Otra indicación más de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que se pueden usar los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

El término "ácido nucleico" se usa aquí de manera intercambiable con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros en forma de cadena simple o doble. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o unidades estructurales o enlaces de esqueleto modificados, que son sintéticos, naturales y no naturales, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a la nucleótidos de referencia. Ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos 2-O-metilo, ácidos peptidonucleicos (PNA).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes modificadas conservadoramente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, como se detalla a continuación, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) están sustituidos con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzet et al., (1991) *Nucleic Acid Res.* 19: 5081; Ohtsuka et al., (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608; y Rossolini et al., (1994) *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98).

El término "unido operativamente" en el contexto de los ácidos nucleicos se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de polinucleótidos (por ejemplo, ADN). Típicamente, se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora transcripcional a una secuencia transcrita. Por ejemplo, una secuencia promotora o potenciadora está unida operativamente a una secuencia de codificación si estimula o modula la transcripción de la secuencia de codificación en una célula huésped apropiada u otro sistema de expresión. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción que están unidas operativamente a una secuencia transcrita son físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, actúan en cis. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras de la transcripción, como los potenciadores, no necesitan ser físicamente contiguas o estar ubicadas cerca de las secuencias codificadoras cuya transcripción mejoran.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia polipeptídica particular también abarca implícitamente variantes modificadas conservadoramente de la misma.

El término "inmunoconjugado" o "conjugado de anticuerpos" como se usa en el presente documento se refiere al enlace de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo con otro agente, como un agente quimioterapéutico, una toxina, un agente inmunoterapéutico, una sonda de generación de imágenes, una sonda espectroscópica, y similares. El enlace puede ser enlaces covalentes o interacciones no covalentes, como las fuerzas electrostáticas. Se pueden emplear diversos enlazadores, conocidos en la técnica, para formar el inmunoconjugado. Además, el inmunoconjugado puede proporcionarse en forma de una proteína de fusión que puede expresarse a partir de un polinucleótido que codifica el inmunoconjugado. Como se usa en el presente documento, "proteína de fusión" se refiere a proteínas creadas a través de la unión de dos o más genes o fragmentos de genes que originalmente codificaron proteínas separadas (incluidos péptidos y polipéptidos). La traducción del gen de fusión da como resultado una proteína única con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales.

El término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios y reptiles. Excepto cuando se indica, los términos "paciente" o "sujeto" se usan aquí de manera intercambiable.

El término "citotóxica", o "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente que sea perjudicial para el crecimiento y la proliferación de las células y puede actuar para reducir, inhibir o destruir una célula o malignidad.

El término "agente anticanceroso", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente que pueda usarse para tratar un trastorno de proliferación celular como el cáncer, incluidos, entre otros, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, radioterapia y agentes radioterapéuticos, agentes dirigidos contra el cáncer, y agentes inmunoterapéuticos.

El término "grupo terminal (TG)" como se usa en el presente documento se refiere a una unidad estructural química o una superficie que está conjugada con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención. Por ejemplo, un grupo terminal puede ser un grupo farmacológico seleccionado de un agente anticanceroso, un agente antiinflamatorio, un agente antifúngico, un agente antibacteriano, un agente antiparasitario, un agente antiviral, un agente anestésico. En ciertas realizaciones, un grupo farmacológico se selecciona de un inhibidor de V-ATPasa, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTor, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, una maitansinoide, una metapina (metionina aminopidasa), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, un inhibidor de las reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de la quinasa, un inhibidor de la CDK2, un inhibidor de la CDK9, un inhibidor del proteasoma, un inhibidor de la ARN polimerasa y Eg5 inhibidor, un inhibidor de HDAC, un agente dañino de ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalador de ADN, un ligante de surco menor de ADN y un inhibidor de DHFR. Ejemplos adecuados incluyen auristatinas tales como MMAE y MMAF; caliqueamicinas tales como gamma-caliqueamicina; y maitansinoides tales como DM1 y DM4. Los métodos para unir cada uno de estos a un enlazador compatible con los anticuerpos y El método de la invención son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Singh et al., *Therapeutic Anti-bodies: Methods and Protocols*, vol. 525, 445-457 (2009). Además, un grupo terminal puede ser una sonda biofísica, un fluoróforo, una marca de rotación, una sonda de infrarrojos, una sonda de afinidad, un quelante, una sonda espectroscópica, una sonda radioactiva, una molécula lipídica, un polietilenglicol, un polímero, una etiqueta de rotación, ADN, ARN, una proteína, un péptido, una superficie, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una nanopartícula, un punto cuántico, un liposoma, una partícula de PLGA o un polisacárido. En algunos aspectos de la divulgación, en donde el grupo terminal es una superficie, tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

"Tumor" se refiere al crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

El término "actividad antitumoral" significa una reducción en la velocidad de proliferación, viabilidad o actividad metastásica de las células tumorales. Una posible forma de mostrar actividad antitumoral es mostrar una disminución en la tasa de crecimiento de células anormales que surgen durante la terapia o la estabilidad o reducción del tamaño del tumor. Dicha actividad puede evaluarse utilizando modelos de tumores *in vitro* o *in vivo* aceptados, que incluyen, entre otros, modelos de xenoinjerto, modelos de aloinjerto, modelos de MMTV y otros modelos conocidos en la técnica para investigar la actividad antitumoral.

El término "malignidad" se refiere a un tumor no benigno o un cáncer. Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" incluye una neoplasia maligna caracterizada por el crecimiento celular desregulado o no controlado. Cánceres de ejemplo incluyen: carcinomas, sarcomas, leucemias y linfomas.

El término "cáncer" incluye tumores malignos primarios (por ejemplo, aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto que no sean el sitio del tumor original) y tumores malignos secundarios (por ejemplo, aquellos derivados de la metástasis, la migración de células tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

El término "inserción" en el contexto de insertar una etiqueta peptídica en un anticuerpo significa la incorporación de una etiqueta peptídica entre dos residuos específicos de un anticuerpo. El número total de residuos del anticuerpo aumenta por el número de residuos de la etiqueta insertada.

El término "injerto" en el contexto de incorporar una etiqueta peptídica en un anticuerpo se refiere a la incorporación de una etiqueta peptídica en un anticuerpo por mutagénesis. Por ejemplo, un tramo corto de residuos de aminoácidos dentro de un bucle no CDR se sustituye por una secuencia peptídica. En este caso, el número total de residuos del anticuerpo permanece sin cambios. En algunos aspectos de la divulgación, el término "injerto" también abarca una combinación de sustitución e inserción de residuos de etiqueta peptídica. Por ejemplo, una parte de la etiqueta peptídica se incorpora mediante la sustitución de los residuos del bucle estructural, mientras que la parte restante se inserta entre los residuos específicos del bucle sin CDR. El número total de residuos del anticuerpo IgG aumenta en un número que es más pequeño que el número de residuos de etiqueta.

Breve descripción de las figuras.

Figura 1. Descripción esquemática de la generación de ADC mediada por 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa).

Figura 2. Diseño de constructos de IgG1 que contienen etiquetas peptídicas para la marcación de anticuerpos específicos del sitio a través de 4'-fosfopanteteinilación postraducción. (A) Los constructos de IgG1 contienen etiquetas peptídicas (subrayadas) en los dominios V_H, CH1 y CH3. (B) Los constructos de IgG1 contienen etiquetas peptídicas (subrayadas) en los dominios CH3, V_L y C_L. Los constructos diseñados que se clonaron con éxito están marcados con un signo más (+) en la columna izquierda. La clonación incorrecta se indica mediante un signo menos (-). Los constructos clonados con éxito se agrupan como no-expresores (-) y expresores (+) (columna central). Los expresores que no muestran ninguna formación de producto catalizada por Sfp detectable en presencia de sustrato de CoA-MC-MMAF (el sustrato de acetil-CoA se usó para las SEQ ID NO: 28, 105, 118, 120, 123 y 126) están marcados con un signo menos (-) en la columna derecha. La formación muy baja pero detectable de los respectivos

MC-MMAF ADC se indica con un símbolo más (+). Una formación de ADC MC-MMAF significativamente más eficiente pero no cuantitativa se indica mediante un signo más (++) doble. Los ADC de MC-MMAF generados cuantitativamente con dos grupos terminales (TG) se clasifican con una calificación triple más (+++) (según el análisis de HPLC). Las posiciones de residuos descritas en la figura 2(A) y la figura 2(B) son los "residuos de" indicados en la SEQ ID NO correspondiente al sistema de numeración Eu para cada secuencia.

La figura 2(A) describe los residuos 1-68 de la SEQ ID NO: 1130, los residuos 1-80 de la SEQ ID NO: 94, los residuos 1-79 de la SEQ ID NO: 95, los residuos 1-80 de la SEQ ID NO: 96, los residuos 1-72 de la SEQ ID NO: 1130, residuos 1-80 de la SEQ ID NO: 99, residuos 1-79 de la SEQ ID NO: 97, residuos 1-77 de la SEQ ID NO: 98, residuos 122-198 de la SEQ ID NO: 1130, residuos 1-77 de la SEQ ID NO: 100, residuos 1-77 de la SEQ ID NO: 102, residuos 1-77 de la SEQ ID NO: 101, residuos 1-77 de la SEQ ID NO: 105, residuos 1-77 de la SEQ ID NO: 107, residuos 122-190 de la SEQ ID NO: 1130, residuos 1-76 de la SEQ ID NO: 108, residuos 1-75 de la SEQ ID NO: 103, residuos 1-74 de la SEQ ID NO: 106, residuos 164-231 de la SEQ ID NO: 1130, residuos 43-115 de la SEQ ID NO: 118, residuos 43-115 de la SEQ ID NO: 110, residuos 43-114 de la SEQ ID NO: 113, residuos 164-240 de la SEQ ID NO: 1130, residuos 43-119 de la SEQ ID NO: 119, residuos 43-119 de la SEQ ID NO: 109, residuos 43-119 de la SEQ ID NO: 112, residuos 43-119 de la SEQ ID NO: 111, residuos 43-119 de la SEQ ID NO: 114, residuos 43-119 de la SEQ ID NO: 115, residuos 43-119 de la SEQ ID NO: 116, residuos 43-119 de la SEQ ID NO: 117, residuos 324-400 de la SEQ ID NO: 1130, residuos 203-279 de la SEQ ID NO: 123 y residuos 203-279 de SEQ ID NO: 120, todos respectivamente, en orden de aparición.

La figura 2(B) describe los residuos 324-388 de la SEQ ID NO: 1130, residuos 203-278 de la SEQ ID NO: 122, residuos 203-279 de la SEQ ID NO: 121, residuos 373-449 de la SEQ ID NO: 1130, residuos 252-328 de la SEQ ID NO: 124, residuos 252-328 de la SEQ ID NO: 125, residuos 252-328 de la SEQ ID NO: 135, residuos 252-328 de la SEQ ID NO: 137, residuos 252-328 de la SEQ ID NO: 138, residuos 373-444 de la SEQ ID NO: 1130, residuos 252-328 de la SEQ ID NO: 134, residuos 390-449 de la SEQ ID NO: 1130, residuos 269-340 de la SEQ ID NO: 127, residuos 269-335 de la SEQ ID NO: 126, residuos 269-339 de la SEQ ID NO: 129, residuos 269-337 de la SEQ ID NO: 131, residuos 269-338 de la SEQ ID NO: 130, residuos 269-340 de la SEQ ID NO: 132, residuos 269-340 de la SEQ ID NO: 136, residuos 383-449 de la SEQ ID NO: 1130, residuos 262-341 de la SEQ ID NO: 140, residuos 262-340 de la SEQ ID NO: 139, residuos 262-340 de la SEQ ID NO: 141, residuos 1-68 de la SEQ ID NO: 1131, residuos 1-80 de la SEQ ID NO: 26, residuos 1-79 de la SEQ ID NO: 27, residuos 76-152 de la SEQ ID NO: 1131, residuos 76-160 de SEQ ID NO: 30, residuos 150-214 de SEQ ID NO: 1131, residuos 42-117 de SEQ ID NO: 29 y residuos 42-118 de SEQ ID NO: 28, todos respectivamente, en orden de aparición.

Figura 3. (A) Secuencia del dominio CH1, el dominio CH2, el dominio CH3 y la región bisagra de la cadena pesada de Ig gamma 1 (SEQ ID NO: 93). (B) Secuencia del dominio C_L de la cadena ligera de Ig kappa (SEQ ID NO: 24). Los aminoácidos subrayados son bucles estructurales. Las posiciones de los aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración Eu como se describe en Edelman et al., Proc. Natl Acad USA 63: 78-85 (1969). X'₁, X'₂, X'₃, X'₄, X'₅ y X'₆ indican residuos que están presentes en posiciones alotípicas dentro de la subclase IgG1 y el isotipo kappa (según Jefferis et al., MAbs. 1: 332-338 (2009)).

Figura 4. (A) Alineación de la secuencia del dominio CH1, el dominio CH2, el dominio CH3 y la región bisagra de las cuatro subclases gamma de Ig humanas con Trastuzumab (SEQ ID NOs 1109-1113, respectivamente, en orden de aparición). (B) Alineación de secuencias del dominio C_L con Trastuzumab (SEQ ID NOs 1114-1115, respectivamente, en orden de aparición). Los residuos subrayados pertenecen a bucles estructurales (véase también la figura 3). Los residuos en caja indican posiciones alotípicas de acuerdo con Jefferis et al., MAbs. 1: 332-338 (2009). Para simplificar, solo se muestran las posiciones alotípicas dentro de la subclase IgG1 y el isotipo kappa. Las secuencias de proteínas de las subclases gamma de Ig humana y el isotipo kappa humano se derivan de la base de datos UniProt (números de entrada P01857, P01859, P01860, P01861 y P01834).

Figura 5. Caracterización por HPLC de la formación de ADC catalizada por Sfp. (A) señal de HPLC que confirma la formación casi cuantitativa del inmunoconjugado anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 1117). (B) señal de HPLC que confirma la formación casi cuantitativa del inmunoconjugado anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 1118). (C) señal de HPLC que confirma la formación casi cuantitativa del inmunoconjugado anti-hHER2-HC-V2-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q3 (SEQ ID NO: 1119). (D) señal de HPLC que confirma la formación cuantitativa del inmunoconjugado anti-hHER2-HC-V2-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q3 (SEQ ID NO: 1120). (E) señal de HPLC que confirma la formación casi cuantitativa del inmunoconjugado anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKL-N389 (SEQ ID NO: 1121). (F) señal de HPLC que confirma la formación cuantitativa del inmunoconjugado anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389 (SEQ ID NO: 1122). (G) señal de HPLC que confirma la formación casi cuantitativa del inmunoconjugado mAb2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 1123). (H) señal de HPLC que ejemplifica la formación parcial del inmunoconjugado anti-hHER2-LC-I2-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q3 (SEQ ID NO: 1124).

Figura 6. Caracterización de tres inmunoconjugados de trastuzumab por cromatografía analítica de exclusión por tamaño (AnSEC) ejemplifica la formación de ADC monoméricos, no agregados. (A) Análisis AnSEC del inmunoconjugado anti-hHER2-HC-V2-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q3 (SEQ ID NO: 1120). (B) Análisis de AnSEC del inmunoconjugado anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389 (SEQ ID NO: 1122). (C)

Análisis de AnSEC del inmunoc conjugado anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKL-N389 (SEQ ID NO: 1121).

Figura 7. Caracterización por HPLC de la marcación sin éxito de trastuzumab con la incorporación de una etiqueta peptídica en una ubicación específica. La señal de HPLC indica que no hay conjugación entre anti-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L (SEQ ID NO: 114) y CoA-MC-MMAF.

Figura 8. Caracterización por HPLC de la marcación de constructos de injerto/inserción mixtos con CoA-MC-MMAF. (A) señal de HPLC que indica la formación parcial del inmunoc conjugado anti-hHER2-HC-S63-ppan-MC-MMAF-V64L-EFIASKLA-K65 (SEQ ID NO: 1125). (B) señal de HPLC que indica que no hay formación del inmunoc conjugado anti-hHER2-LC-S76D-S77-ppan-MC-MMAF-L78-EFIASKLA-Q79 (SEQ ID NO: 1126).

Figura 9. Caracterización por HPLC de la unión del fluoróforo a las IgG. (A) señal de HPLC que confirma la formación casi cuantitativa del anticuerpo-fluoróforo conjugado anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-ppan-maleimidoetilamido-TMR-S192L-L193S-G194W-T195L (SEQ ID NO: 1127). El amplio solapamiento entre las señales de HPLC monitorizadas a 280 y 555 nm indica una conjugación fluorófora casi cuantitativa. (B) señal de HPLC que confirma la formación casi cuantitativa del anticuerpo conjugado de fluoróforo anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-maleimidoetilamido-TMR-LSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 1128). El amplio solapamiento entre las señales de HPLC monitorizadas a 280 y 555 nm indica una conjugación fluorófora casi cuantitativa.

Figura 10. Caracterización por HPLC de la marcación de anticuerpos con citotoxinas unidas a maleimido o bromoacetil tioéter hidrolizadas. (A) señal de HPLC que confirma la conjugación casi cuantitativa de CoA-MC-MMAF con anillo de maleimida con anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121). (B) señal de HPLC que confirma la conjugación casi cuantitativa de CoA-Ac-Ahx-MMAF con anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121).

Figura 11. Caracterización por HPLC de la marcación de anticuerpos con citotoxinas conectadas a través de un enlazador escindible. (A) señal de HPLC que confirma la conjugación casi cuantitativa de CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAF con anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121). (B) señal de HPLC que confirma la conjugación casi cuantitativa de CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAF con anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 127).

Figura 12. Optimización de la formación de ADC catalizada por 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) en función del pH. La representación del gráfico de barras muestra la cantidad de ADC generado con una relación de fármaco a anticuerpo (DAR) de 2 en función del pH. Los datos se basan en el análisis de HPLC (280 nm) de la reacción de CoA-MC-MMAF con anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121) o anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 127) a un rango de pH de 5.0 a 10.0.

Figura 13. Optimización de la reacción de conjugación en función de la concentración de enzima Sfp en el regulador HEPES 50 mM (pH 7.5) que contiene un anticuerpo 2.5 μ M, CoA-MC-MMAF 50 μ M y $MgCl_2$ 10 mM (37°C, 16 horas). (A) Espectro de masas en desconvolución que muestra principalmente anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389 no conjugado (SEQ ID NO: 127) a una concentración de Sfp de 0.1 μ M. (B) Espectro de masas en desconvolución que muestra una formación de ADC casi cuantitativa de anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 1118) a una concentración de Sfp de 0.25 μ M. (C) Espectro de masas en desconvolución que muestra una formación de ADC casi cuantitativa de anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 1118) a una concentración de Sfp de 0.5 μ M.

Figura 14. Optimización de la reacción de conjugación enzimática en función de la concentración de sustrato de CoA-MC-MMAF a pH 8.0. (A) Las señales de HPLC representan tres reacciones de conjugación con 2.5 μ M de anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 127) que contenía 2.5 μ M (señal superior), 7.5 μ M (señal media) o 25 μ M (señal inferior) de CoA-MC-MMAF. El pico a un tiempo de retención de 4.9 min corresponde al anticuerpo no marcado (DAR = 0), el pico a los 5.3 min del anticuerpo monomarcado (DAR = 1) y el pico a los 5.7 min del anticuerpo bimarcado (DAR = 2). (B) La representación del gráfico de barras muestra la cantidad de ADC generado con un DAR de 2 en función de la concentración de sustrato de CoA-MC-MMAF. La serie de titulación se realizó a una concentración de enzima Sfp de 0.25 μ M (barras negras) o 1.0 μ M (barras blancas).

Figura 15. Estabilidad térmica de ADCs marcados con péptidos, medida por fluorometría de barrido diferencial (DSF) utilizando tinción de gel SYPRO Orange. (A) Determinación de la estabilidad térmica del inmunoc conjugado anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 1117). Se observan dos temperaturas de transición de 68.5 y 81.5 grados Celsius por DSF (promedio de dos mediciones). (B) Determinación de la estabilidad térmica del inmunoc conjugado anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 1118). DSF (medición única) observa dos temperaturas de transición de 66.3 y 81.0 grados Celsius. (C) Determinación de la estabilidad térmica de Trastuzumab IgG1 no modificado (anti-hHER2) que se usó como referencia para la comparación con ADCs marcados con péptidos. Se observan dos temperaturas de transición de 69.7 y 81.1 grados Celsius por DSF (promedio de dos mediciones).

Figura 16. Estudio farmacocinético (PK) de dos inmunoc conjugados de Trastuzumab marcados con péptidos. Los títulos plasmáticos de ambos ADC se determinaron capturando los inmunoc conjugados respectivos con HER2 humano

absorbido en placa (dominios extracelulares 3-4) seguido de detección con anticuerpos IgG antihumanos y anti-MMAF. (A) Comparación de los títulos en plasma de anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 1117) y del anticuerpo no modificado de Trastuzumab (anti-hHER2) por ELISA. El título de plasma del inmunoconjugado exhibe un rápido deterioro en 4 días. (B) Comparación de los títulos plasmáticos de anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 1118) y el anticuerpo no modificado de Trastuzumab (anti-hHER2) por ELISA. El título en plasma del inmunoconjugado se asemeja mucho al título de control del anticuerpo anti-hHER2 no modificado dentro de un período de 14 días.

Figura 17. Ensayo *in vitro* de destrucción de células de inmunoconjugados marcados con péptidos utilizando la línea celular MDA-231 que expresa HER2. Las representaciones se basan en las mediciones de la viabilidad celular utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente Glo de título celular (Promega). La figura describe 'anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360', 'anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389', 'anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-K360', y 'anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389' como SEQ ID NOS 1117, 1118, 1108 y 1107, respectivamente.

Figura 18. Diagrama que ilustra la influencia del sitio de inserción de la etiqueta del péptido en la estabilidad térmica del anticuerpo IgG. De acuerdo con la fluorometría de barrido diferencial (DSF) que utiliza la tinción con gel SYPRO Orange, la primera temperatura de transición (T_m) disminuye significativamente para los anticuerpos que contienen inserciones de etiqueta peptídica en el dominio CH2 de la región Fc (residuos de aminoácidos 228-340). En contraste con eso, las inserciones de la etiqueta peptídica en el dominio CH1 de la región Fab desestabilizan el andamiaje del anticuerpo en un grado mucho menor, con valores de T_m generalmente no más de 3 grados Celsius más bajos que el Trastuzumab IgG1 no modificado con una T_m de 69.7°C.

Figura 19. Generación enzimática de ADCs con un DAR de 4. (A) Los ADCs con un DAR de 4 pueden generarse incorporando múltiples etiquetas peptídicas en un anticuerpo, como las etiquetas ybbR y S6. (B) Análisis de HPLC de la conjugación catalizada por Sfp de CoA-MC-MMAF con Trastuzumab IgG que contiene una etiqueta S6 en el dominio V_H , así como una etiqueta ybbR en el dominio CH3 (anti-hHER2-HC-V2-GDSLWLLRLLN-Q3-E388-DSLEFIASKLA-N389 (SEQ ID NO: 142)). La incubación a temperatura ambiente de 2.5 μ M de anticuerpo y 50 μ M de sustrato de CoA en presencia de 1 μ M de enzima Sfp conduce a la formación casi cuantitativa de un ADC con un DAR de 4 (t_R = 6.1 min, señal inferior). La señal superior representa el correspondiente anticuerpo no acoplado (DAR = 0, t_R = 5.2 min).

Figura 20. Perfiles farmacocinéticos de inmunoconjugados de trastuzumab marcados con péptidos que muestran valores de IgG de AUC altos y bajos. Cada uno de los seis ADC marcados con péptidos correspondientes a SEQ ID NO: 248 (A), SEQ ID NO: 33 (B), SEQ ID NO: 251 (C), SEQ ID NO: 218 (D), SEQ ID NO: 202 (E) y SEQ ID NO: 244 (F) se administraron por vía intravenosa en tres ratones a una dosis única de 1 mg/kg. Después de la recolección de muestras de plasma durante un período de tiempo de 340 horas, las moléculas de trastuzumab ADC se capturaron utilizando el dominio extracelular inmovilizado de HER2 humano. Los títulos de plasma se determinaron luego por dos formatos ELISA basados en anticuerpos anti-MMAF o anti-hlgG. Mientras que el primer formato proporciona lectura sobre la concentración de ADC "intacto", el último formato genera una señal proporcional a la concentración de IgG total, que comprende moléculas de trastuzumab conjugadas y no conjugadas. A - C ejemplifica las curvas PK de los ADC MMAF marcados con péptidos que muestran valores altos de IgG de AUC, mientras que D - F muestra ejemplos de inmunoconjugados que exhiben valores muy bajos de IgG de AUC. En todos los casos, los títulos anti-MMAF y anti-hlgG son paralelos entre sí, lo que indica una desconjugación insignificante de la carga útil de MMAF durante el transcurso del tiempo del estudio PK.

Figura 21. Correlación entre los títulos de anti-MMAF y anti-hlgG de 86 ADCs marcados con péptidos. De acuerdo con este gráfico, las lecturas de concentración de IgG total y ADC "intacto" están en estrecha concordancia entre sí, lo que sugiere un enlace ppan-MC altamente estable entre la carga útil de MMAF y el anticuerpo marcado con péptido. Además de la desconjugación despreciable del fármaco MMAF *in vivo*, esta correlación altamente lineal también indica que la unión de la carga útil covalente no afecta negativamente al perfil farmacocinético del inmunoconjugado.

Figura 22. Método de dos etapas que implica la modificación postraducción de un anticuerpo marcado con A1 con un análogo de CoA funcionalizado con carbonilo para la posterior unión del grupo terminal (TG) a través de la ligación de oxima. En el primer paso, el anticuerpo marcado con A1 se marca específicamente en el sitio con un análogo de CoA funcionalizado con cetona o aldehído en medio de cultivo celular. Después de la cromatografía de afinidad de proteína A, el grupo carbonilo de la unidad estructural ppan se hace reaccionar con un TG derivado con aminooxi.

Figura 23. Estudio de eficacia *in vivo* del trastuzumab ADC anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389 marcado con ybbR (SEQ ID NO: 1122) en ratones desnudos inmunodeficientes implantados con una línea celular de tumor humano. El modelo de tumor de xenoinjerto se realizó con ratones nu/nu que se administraron por vía subcutánea con el clon 16 de la línea celular de cáncer de mama dependiente de HER2 MDA-MB231. Después de que el tumor creció a un tamaño de aproximadamente 200 mm³, se administraron dosis únicas de 3 mg/kg. (▲), 5 mg/kg (●) del ADC marcado con ybbR o el vehículo solo (■) se inyectaron por vía intravenosa en nueve ratones por grupo de tratamiento. La flecha vertical indica el punto de tiempo de la administración de ADC. La monitorización semanal del crecimiento del tumor reveló que ambos niveles de dosis dieron como resultado la regresión del tumor que demuestra la eficacia *in vivo* del ADC marcado con péptido.

Descripción detallada

La presente invención proporciona métodos de marcación de anticuerpos específicos para el sitio, utilizando proteínas que tienen actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa ("PPTasas") que catalizan la modificación postraduccion de secuencias peptídicas ("etiquetas peptídicas") incorporadas en uno o más sitios específicos de un anticuerpo de interés. La marcación enzimática en condiciones de reacción ambiental permite la modificación covalente cuantitativa e irreversible de un residuo de serina específico dentro de las etiquetas peptídicas incorporadas en el anticuerpo, y por lo tanto crea conjugados de anticuerpos deseables.

Dada la amplia tolerancia al sustrato de las PPTasas, la marcación del anticuerpo específico del sitio de acuerdo con la presente invención se puede lograr con una variedad de reactivos de marcación químicamente accesibles, tales como agentes anticancerosos, fluoróforos, péptidos, azúcares, detergentes, polietilenglicoles, potenciadores inmunes, sondas de generación de imágenes, profármacos y otras moléculas. Además, las PPTasas se pueden usar para inmovilizar anticuerpos marcados con péptidos en un soporte sólido, tales como nanopartículas de poliestireno y superficies de oro (véase, por ejemplo, Wong et al., Org. Biomol. Chem. 8: 782-787, 2010; Wong et al., Nanoscale 4: 659-666, 2012, para metodologías de inmovilización de enzimas funcionales).

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos de preparación de inmunoconjugados homogéneos con una relación de fármaco a anticuerpo definida para uso en terapia contra el cáncer, e inmunoconjugados preparados de este modo, así como composiciones farmacéuticas que comprenden estos inmunoconjugados. Los métodos de la presente invención se pueden usar en combinación con otros métodos de conjugación conocidos en la técnica.

1. Ingeniería de anticuerpos

Marcación específica del sitio

Un "bucle estructural" o un "bucle sin CDR" según la presente invención debe entenderse de la siguiente manera: los anticuerpos están formados por dominios con pliegues de inmunoglobulina. En esencia, las hojas beta antiparalelas están conectadas por bucles para formar un barril beta antiparalelo comprimido. En la región variable, algunos de los bucles de los dominios contribuyen esencialmente a la especificidad del anticuerpo, es decir, la unión a un antígeno. Estos bucles se denominan "bucles CDR". Todos los otros bucles de dominios de anticuerpos contribuyen más bien a la estructura de la molécula y/o la función efectora. Estos bucles se definen aquí como "bucles estructurales" o "bucles no CDR".

Los anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo parental o nativo, que contiene opcionalmente uno o más aminoácidos no naturales) de la presente invención están numerados de acuerdo con el sistema de numeración Eu como se expone en Edelman et al., Proc. Natl Acad USA 63: 78-85 (1969). La región constante de IgG1 humana se utiliza como representante en toda la solicitud. Sin embargo, la invención no se limita a la IgG1 humana; las posiciones de aminoácidos correspondientes se pueden deducir fácilmente mediante la alineación de secuencias. Por ejemplo, la fig. 3 (A) muestra la región constante de la cadena pesada de IgG1 donde los bucles estructurales están subrayados, estos bucles estructurales subrayados se pueden identificar fácilmente para IgG2, IgG3 e IgG4 como se muestra en el alineamiento de secuencias de la Figura 4 (A). Figura 3 (B) muestra la región constante de la cadena ligera donde los bucles estructurales están subrayados. Para la región constante de la cadena ligera, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 son iguales. La Tabla 1 a continuación enumera las posiciones de aminoácidos en el bucle estructural de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, respectivamente.

Tabla 1. Posiciones de bucle estructural identificadas (IgG1 de acuerdo con la numeración Eu)

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Cadena pesada	119(S)120(T)121(K)	119(S)120(T)121(K)	119(S)120(T)121(K)	119(S)120(T)121(K)
	131(S)132(S)133(K)	131(C)132(S)133(R)	131(C)132(S)133(R)	131(C)132(S)133(R)
	134(S)135(T)136(S)	134(S)135(T)136(S)	134(S)135(T)136(S)	134(S)135(T)136(S)
	137(G)138(G)139(T) (SEQ ID NO: 1018)	137(E)138(S)139(T) (SEQ ID NO: 1019)	137(G)138(G)139(T) (SEQ ID NO: 1020)	137(E)138(S)139(T) (SEQ ID NO: 1019)
	152(E)153(P)154(V)	152(E)153(P)154(V)	152(E)153(P)154(V)	152(E)153(P)154(V)
	159(N)160(S)161(G)	159(N)160(S)161(G)	159(N)160(S)161(G)	159(N)160(S)161(G)

ES 2 703 540 T3

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	162(A)163(L)164(T)	162(A)163(L)164(T)	162(A)163(L)164(T)	162(A)163(L)164(T)
	165(S)166(G) (SEQ ID NO: 1021)	165(S)166(G) (SEQ ID NO: 1021)	165(S)166(G) (SEQ ID NO: 1021)	165(S)166(G) (SEQ ID NO: 1021)
	171(P)172(A)	171(P)172(A)	171(P)172(A)	171(P)172(A)
	176(S)177(S)178(G)	176(S)177(S)178(G)	176(S)177(S)178(G)	176(S)177(S)178(G)
	189(P)190(S)191(S)	189(P)190(S)191(S)	189(P)190(S)191(S)	189(P)190(S)191(S)
	192(S)193(L)194(G)	192(N)193(F)194(G)	192(S)193(L)194(G)	192(S)193(L)194(G)
	195(T)196(Q)197(T) (SEQ ID NO: 1022)	195(T)196(Q)197(T) (SEQ ID NO: 1023)	195(T)196(Q)197(T) (SEQ ID NO: 1022)	195(T)196(K)197(T) (SEQ ID NO: 1024)
	205(K)206(P)207(S)	205(K)206(P)207(S)	205(K)206(P)207(S)	205(K)206(P)207(S)
	208(N) (SEQ ID NO: 1025)	208(N) (SEQ ID NO: 1025)	208(N) (SEQ ID NO: 1025)	208(N) (SEQ ID NO: 1025)
	230(P)231(A)232(P)	227(P)228(A)229(P)	277(P)278(A)279(P)28	227(P)228(A)229(P)
	233(E)234(L)235(L)	230(P)231(V)232(A)	0(E)281(L)282(L)283(	230(E)231(F)232(L)
	236(G)236(G) (SEQ ID NO: 1026)	233(G) (SEQ ID NO: 1027)	G)284(G) (SEQ ID NO: 1026)	233(G)234(G) (SEQ ID NO: 1028)
	244(P)245(P)246(K)	240(P)241(P)242(K)	291(P)292(P)293(K)	241(P)242(P)243(K)
	253(I)254(S)255(R)	249(I)250(S)251(R)	300(I)301(S)302(R)	250(I)251(S)252(R)
	256(T)257(P)258(E) (SEQ ID NO: 1029)	252(T)253(P)254(E) (SEQ ID NO: 1029)	303(T)304(P)305(E) (SEQ ID NO: 1029)	253(T)254(P)255(E) (SEQ ID NO: 1029)
	267(S)268(H)269(E)	263(S)264(H)265(E)	314(S)315(H)316(E)	264(S)265(Q)266(E)
	270(D)271(P)272(E) (SEQ ID NO: 1030)	266(D)267(P)268(E) (SEQ ID NO: 1030)	317(D)318(P)319(E) (SEQ ID NO: 1030)	267(D)268(P)269(E) (SEQ ID NO: 1031)
	280(D)281(G)	276(D)277(G)	327(D)328(G)	277(D)278(G)
	285(H)286(N)287(A)	281(H)282(N)283(A)	332(H)333(N)334(A)	282(H)283(N)284(A)
	291(P)292(R)	287(P)288(R)	338(P)339(R)	288(P)289(R)
	295(Q)296(Y)297(N)	291(Q)292(F)293(N)	342(Q)343(Y)344(N)	292(Q)293(F)294(N)
	298(S)299(T) (SEQ ID NO: 1032)	294(S)295(T) (SEQ ID NO: 1033)	345(S)346(T) (SEQ ID NO: 1032)	295(S)296(T) (SEQ ID NO: 1033)

ES 2 703 540 T3

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	307(T)308(V)309(L)	303(T)304(V)305(V)	354(T)355(V)356(L)	304(T)305(V)306(L)
	310(H)311(Q) (SEQ ID NO: 1034)	306(H)307(Q) (SEQ ID NO: 1035)	357(H)358(Q) (SEQ ID NO: 1034)	307(H)308(Q) (SEQ ID NO: 1034)
	315(N)316(G)317(K)	311(N)312(G)313(K)	362(N)363(G)364(K)3	312(N)313(G)314(K)
	318(E) (SEQ ID NO: 1036)	314(E) (SEQ ID NO: 1036)	65(E) (SEQ ID NO: 1036)	315(E) (SEQ ID NO: 1036)
	326(K)327(A)328(L)	322(K)323(G)324(L)	373(K)374(A)375(L)	323(K)324(G)325(L)
	329(P)330(A)331(P) (SEQ ID NO: 1037)	325(P)326(A)327(P) (SEQ ID NO: 1038)	376(P)377(A)378(P) (SEQ ID NO: 1037)	326(P)327(S)328(S) (SEQ ID NO: 1039)
	339(A)340(K)341(G)	335(T)336(K)337(G)	386(T)387(K)388(G)	336(A)337(K)338(G)
	342(Q)343(P)344(R)345(E) (SEQ ID NO: 1040)	338(Q)339(P)340(R)341(E) (SEQ ID NO: 1041)	389(Q)390(P)391(R)392(E) (SEQ ID NO: 1041)	339(Q)340(P)341(R)342(E) (SEQ ID NO: 1040)
	355(R)356(D/E)	351(R)352(E)353(E)	402(R)403(E)404(E)	352(Q)353(E)354(E)
	357(E)358(L/M)	354(M)355(T)356(K)357(N) (SEQ ID NO: 1043)	405(M)406(T)407(K)408(N) (SEQ ID NO: 1043)	355(M)356(T)357(K)
	359(T)360(K)361(N) (SEQ ID NO: 1042)			358(N) (SEQ ID NO: 1044)
	384(N)385(G)	380(N)381(G)	431(S)432(G)	381(N)382(G)
	388(E)389(N)390(N)	384(E)385(N)386(N)	435(E)436(N)437(N)	385(E)386(N)387(N)
	394(T)395(P)396(P)	390(T)391(P)392(P)	441(T)442(P)443(P)	391(T)392(P)393(P)
	399(D)400(S)401(D)	395(D)396(S)397(D)	446(D)447(S)448(D)	396(D)397(S)398(D)
	402(G) (SEQ ID NO: 1045)	398(G) (SEQ ID NO: 1045)	449(G) (SEQ ID NO: 1045)	399(G) (SEQ ID NO: 1045)
	415(S)416(R)	411(S)412(R)413(W)	462(S)463(R)464(W)	412(S)413(R)414(W)
	417(W)418(Q)	414(Q)415(Q)416(G)	465(Q)466(Q)467(G)	415(Q)416(E)417(G)
	419(Q)420(G)	417(N)418(V) (SEQ ID NO: 1046)	468(N)469(I) (SEQ ID NO: 1047)	418(N)419(V) (SEQ ID NO: 1048)
	421(N)422(V) (SEQ ID NO: 1046)			
	433(H)434(N)435(H)	429(H)430(N)431(H)	480(H)481(N)482(R)	430(H)431(N)432(H)

ES 2 703 540 T3

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	442(S)443(L)444(S)	438(S)439(L)440(S)	489(S)490(L)491(S)	439(S)440(L)441(S)
	445(P)446(G) (SEQ ID NO: 1049)	441(P)442(G) (SEQ ID NO: 1049)	492(P)493(G) (SEQ ID NO: 1049)	442(L)443(G) (SEQ ID NO: 1050)
Cadena liviana	109(T)110(V)111(A)	109(T)110(V)111(A)	109(T)110(V)111(A)	109(T)110(V)111(A)
	112(A) (SEQ ID NO: 1051)	112(A) (SEQ ID NO: 1051)	112(A) (SEQ ID NO: 1051)	112(A) (SEQ ID NO: 1051)
	119(P)120(P)121(S)	119(P)120(P)121(S)	119(P)120(P)121(S)	119(P)120(P)121(S)
	122(D)123(E) (SEQ ID NO: 1052)	122(D)123(E) (SEQ ID NO: 1052)	122(D)123(E) (SEQ ID NO: 1052)	122(D)123(E) (SEQ ID NO: 1052)
	140(Y)141(P)142(R)	140(Y)141(P)142(R)	140(Y)141(P)142(R)	140(Y)141(P)142(R)
	143(E)144(A) (SEQ ID NO: 1053)	143(E)144(A) (SEQ ID NO: 1053)	143(E)144(A) (SEQ ID NO: 1053)	143(E)144(A) (SEQ ID NO: 1053)
	151(D)152(N)153(A)	151(D)152(N)153(A)	151(D)152(N)153(A)	151(D)152(N)153(A)
	154(L)155(Q)156(S)	154(L)155(Q)156(S)	154(L)155(Q)156(S)	154(L)155(Q)156(S)
	(SEQ ID NO: 1054)	(SEQ ID NO: 1054)	(SEQ ID NO: 1054)	(SEQ ID NO: 1054)
	161(E)162(S)163(V)	161(E)162(S)163(V)	161(E)162(S)163(V)	161(E)162(S)163(V)
	164(T)165(E)166(Q)	164(T)165(E)166(Q)	164(T)165(E)166(Q)	164(T)165(E)166(Q)
	167(D)168(S) (SEQ ID NO: 1055)	167(D)168(S) (SEQ ID NO: 1055)	167(D)168(S) (SEQ ID NO: 1055)	167(D)168(S) (SEQ ID NO: 1055)
	197(T)198(H)199(Q)	197(T)198(H)199(Q)	197(T)198(H)199(Q)	197(T)198(H)199(Q)
	200(G)201(L)202(S)	200(G)201(L)202(S)	200(G)201(L)202(S)	200(G)201(L)202(S)
	203(S)204(P) (SEQ ID NO: 1056)	203(S)204(P) (SEQ ID NO: 1056)	203(S)204(P) (SEQ ID NO: 1056)	203(S)204(P) (SEQ ID NO: 1056)
	207(K)208(S)	207(K)208(S)	207(K)208(S)	207(K)208(S)

La figura 3, así como las SEQ ID NOs 24 y 93 representan las secuencias de la región constante de la cadena ligera kappa de Ig y la región constante de la cadena pesada gamma-1 de Ig, respectivamente. X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, y X₆ en las SEQ ID NO: 24 y 93 indican residuos que están presentes en posiciones alotópicas dentro de la subclase IgG1 y el isotipo kappa (según a Jefferis et al., MAb. 1: 332-338 (2009)). X₁ puede ser Arg o Lys, X₂ puede ser Asp o Glu, X₃ puede ser Leu o Met, X₄ puede ser Ala o Gly, X₅ puede ser Val o Ala, y X₆ puede ser Leu o Val.

Debido a la alta homología de secuencia de las regiones constantes de los anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, los hallazgos de la invención no están limitados a ningún anticuerpo específico. Además, los hallazgos de la invención no se limitan al uso de PPTasas. Las posiciones en los lazos estructurales de anticuerpos identificados aquí también se

pueden usar para incorporar otras etiquetas peptídicas, que son sustratos para otros enfoques de conjugación enzimática, como la enzima biotina proteína ligasa (BPL), transglutaminasas y enzimas formadoras de formilglutamina.

En un aspecto de la divulgación, los inmunoconjugados comprenden un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo, y un grupo terminal, en donde dicho anticuerpo modificado o fragmento del mismo comprende una etiqueta peptídica que, por sí misma, es un sustrato de una 4'-fosfopanteteinil-transferasa, y en la que dicho péptido la etiqueta está ubicada dentro de un bucle estructural, o C- o N-terminal del anticuerpo modificado o fragmento del mismo. La presente descripción también proporciona anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos que comprenden una etiqueta peptídica que es un sustrato de una 4'-fosfopanteteinil transferasa, y en la que dicha etiqueta peptídica está localizada dentro de un bucle estructural, o extremo C- o N- del anticuerpo o fragmento en esto. En una realización específica, dicha etiqueta peptídica es uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 21 y 1132 descritas en la Tabla 2. En un aspecto, la etiqueta peptídica se inserta entre dos aminoácidos de un bucle estructural de dicho anticuerpo o fragmento del mismo. En otro aspecto de la divulgación, la etiqueta peptídica se inserta en un bucle estructural, C- o N-terminal de dicho anticuerpo o fragmento del mismo, en donde la etiqueta peptídica reemplaza uno o más aminoácidos del anticuerpo parental o fragmento del mismo. En un aspecto, el bucle estructural se refiere a un bucle estructural localizado en la región CH1, CH2, CH3 o C_L de dicho anticuerpo o fragmento del mismo. La cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo modificado (o su fragmento) pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más etiquetas de proteínas en sus bucles estructurales. En un aspecto, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados contienen 2, 4, 6, 8 o más etiquetas de proteínas en sus bucles estructurales. En otro aspecto, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es Sfp, AcpS, PPTasa de *T. maritima*, PPTasa humana, o una forma mutante de la misma que retiene la actividad de la 4'-fosfopanteteiniltransferasa. En un aspecto, dicha 4'-fosfopanteteinil-transferasa se origina a partir de *Homo sapiens*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima*, *Clostridium thermocellum*, así como cualquier otro genoma de mamíferos, bacterias o hongos. En otro aspecto, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es una proteína homóloga a Sfp, AcpS, PPTasa de *T. maritima*, PPTasa humana o un mutante de los mismos. En una realización, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es de un organismo termófilo. En algunas realizaciones, el anticuerpo parental (anticuerpo sin incorporar la etiqueta peptídica) es un anticuerpo IgG, IgM, IgE o IgA. En algunas realizaciones, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG1. En algunas otras realizaciones, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG2, IgG3 o IgG4.

"Un sustrato de 4'-fosfopanteteinil transferasa" como se usa en este documento significa que la estructura que se describe puede servir como un aceptor para un grupo 4'-fosfopanteteína (ppan) o ppan modificado como se ilustra en el Esquema la de este documento cuando se pone en contacto con 4'-fosfopanteteinil transferasa y CoA o un análogo de CoA que tiene un grupo terminal adjunto.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo modificado o fragmento del mismo, y un grupo terminal, en donde dicho anticuerpo modificado o fragmento del mismo comprende una región CH1, CH2, CH3 y/o C_L, y en donde dichas regiones CH1, CH2, CH3 y/o C_L comprenden además una etiqueta peptídica que, por sí misma, es un sustrato de una 4'-fosfopanteteinil-transferasa. La presente invención también proporciona anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos que comprenden una región CH1, CH2, CH3 y/o C_L, y en donde dicha región CH1, CH2, CH3 y/o C_L comprende además una etiqueta peptídica seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a 21 y 1132, que es un sustrato de una 4'-fosfopanteteinil transferasa. En algunas realizaciones, la etiqueta peptídica se inserta entre dos aminoácidos de un bucle estructural de dicho anticuerpo o fragmento del mismo. En algunos aspectos de la divulgación, la etiqueta peptídica se inserta en un bucle estructural de dicho anticuerpo o fragmento del mismo. La cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo modificado (o su fragmento) pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más etiquetas de proteínas en sus bucles estructurales. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos modificados contienen 2, 4, 6, 8 o más etiquetas de proteínas en sus bucles estructurales. En algunas realizaciones, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es Sfp, AcpS, PPTasa de *T. maritima*, PPTasa humana, o una forma mutante de la misma que retiene la actividad de la 4'-fosfopanteteinil-transferasa. En algunas realizaciones, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa se origina a partir de *Homo sapiens*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima*, *Clostridium thermocellum*, así como cualquier otro genoma de mamíferos, bacterias o hongos. En algunas realizaciones, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es una proteína homóloga a Sfp, AcpS, *T. maritima* PPTasa, o un mutante de los mismos. En una realización, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es de un organismo termófilo. En algunas realizaciones, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG, IgM, IgE o IgA. En una realización específica, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG2, IgG3 o IgG4.

Tal como se usa en el presente documento, la actividad indicada por "retiene" significa que la enzima que se describe mantiene al menos aproximadamente el 10% de la actividad del material de referencia, que es la *B. subtilis* Sfp 4'-fosfopanteteinil-transferasa (véase, por ejemplo, Quadri et al., *Bioquímica* 37: 1585-1595 (1998)). Por ejemplo, una 4'-fosfopanteteinil-transferasa diferente o una forma mutante de la enzima retiene al menos aproximadamente el 10% de la actividad de la 4'-fosfopanteteiniltransferasa en comparación con Sfp en condiciones de reacción idénticas, es decir, utilizando el mismo sustrato de CoA, el mismo anticuerpo marcado con péptido, condiciones de regulador idénticas, sustrato idéntico y concentraciones de enzima, la misma temperatura y la misma duración de la reacción.

La presente divulgación se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo modificado o fragmento del mismo, y un grupo terminal, en donde dicho anticuerpo modificado o fragmento del mismo comprende una etiqueta peptídica que, en sí misma, es un sustrato de una 4'-fosfopanteteinil-transferasa, y en donde dicha etiqueta peptídica

se inserta entre las posiciones 2 y 3 del dominio V_H, las posiciones 63 y 64 del dominio V_H, las posiciones 64 y 65 del dominio V_H, las posiciones 138 y 139 del dominio CH1, las posiciones 197 y 198 del dominio CH1, las posiciones 359 y 360 del dominio CH3, las posiciones 388 y 389 del dominio CH3, el extremo C del dominio CH3 (después de Lys447), y/o las posiciones 2 y 3 del dominio V_L de un anticuerpo parental o un fragmento del mismo. En otro aspecto, la presente invención proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo, y un grupo terminal, en donde dicho anticuerpo modificado o fragmento del mismo comprende una etiqueta peptídica que, por sí misma, es un sustrato de una 4'-fosfopantetilenotransferasa, y en la que la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 110 y 111 de la cadena ligera, o la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 119 y 120, o entre los residuos de aminoácidos 120 y 121, o entre los residuos de aminoácidos 135 y 136, o entre los residuos de aminoácidos 136 y 137, o entre los residuos de aminoácidos 138 y 139, o entre los residuos de aminoácidos 162 y 163, o entre los residuos de aminoácidos 164 y 165, o entre los residuos de aminoácidos 165 y 166, o entre los residuos de aminoácidos 194 y 195, o entre los residuos de aminoácidos 195 y 196 del dominio CH1; o la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 388 y 389 del dominio CH3 de un anticuerpo parental o fragmento del mismo. En algunas realizaciones, la etiqueta del péptido se inserta entre los residuos de aminoácidos 110 y 111 de la cadena ligera, o entre 119 y 120, o entre 120 y 121, o entre 135 y 136, o entre 136 y 137, o entre 138 y 139, o entre 165 y 166 del dominio CH1, o entre 388 y 389 del dominio CH3 de un anticuerpo parental o fragmento del mismo,

En un aspecto, la invención proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo modificado o fragmento del mismo, y un grupo terminal, en donde dicho anticuerpo modificado o fragmento del mismo comprende SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:267, SEQ ID NO:268, SEQ ID NO:277, SEQ ID NO:278, SEQ ID NO:356, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:365, SEQ ID NO:367, SEQ ID NO:371, SEQ ID NO:373, SEQ ID NO:374, SEQ ID NO:380, SEQ ID NO:381 o SEQ ID NO:384.

Con respecto a los inmunoconjugados descritos en el presente documento, en un aspecto, dicha etiqueta peptídica es uno o más péptidos seleccionados de SEQ ID NO: 1 a 21 y 1132 descritos en la Tabla 2. La cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo modificado (o su fragmento) puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más etiquetas de proteínas en sus bucles estructurales. En una realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados contienen 2, 4, 6, 8 o más etiquetas de proteínas en sus bucles estructurales. En otra realización, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es Sfp, AcpS, PPTasa de *T. maritima*, PPTasa humana, o una forma mutante de la misma que retiene la actividad de la 4'-fosfopanteteiniltransferasa. En una realización, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa se origina a partir de *Homo sapiens*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima*, *Clostridium thermocellum*, así como cualquier otro genoma de mamíferos, bacterias o hongos. En una realización específica, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es Sfp y la etiqueta del péptido se selecciona de GDSLWLLRLLN (SEQ ID NO: 1), GDSLWLL (SEQ ID NO: 2), DSLEFIASKLA (SEQ ID NO: 9), GDSLDMLEWSLM (SEQ ID NO: 10), DSLEFIASKL (SEQ ID NO: 18) y DSLEFIASK (SEQ ID NO: 19). En una realización, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG, IgM, IgE o IgA. En una realización específica, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG1. En otra realización específica, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG2, IgG3 o IgG4.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo, y un grupo terminal, en donde dicho anticuerpo modificado o fragmento del mismo comprende una etiqueta peptídica que, por sí misma, es un sustrato de una 4'-fosfopanteteinil-transferasa, y en la que dicha etiqueta peptídica se inserta en un bucle estructural, o extremo C- o N- del anticuerpo o fragmento del mismo. En un aspecto específico de la descripción, dicha etiqueta peptídica se inserta en las posiciones de aminoácidos de 62 a 64 del dominio V_H (mutaciones en los aminoácidos 62 y 63, y la inserción de la unidad estructural de la etiqueta peptídica entre los aminoácidos 63 y 64), en posiciones de aminoácidos de 62 a 65 del dominio V_H (mutaciones en los aminoácidos 62-64, y la inserción de la unidad estructural de la etiqueta peptídica entre los aminoácidos 64 y 65); en las posiciones de aminoácidos de 133 a 139 del dominio CH1 (mutaciones de los aminoácidos 133-138, y la inserción de la unidad estructural de la etiqueta peptídica entre los aminoácidos 138-139), posiciones de aminoácidos de 189 a 195 del dominio CH1, y/o posiciones de aminoácidos de 190 a 198 del dominio CH1 (mutaciones de los aminoácidos 190-197, y la inserción de la unidad estructural de la etiqueta peptídica entre 197 y 198) de un anticuerpo parental o fragmento del mismo. En un aspecto de la divulgación, dicha etiqueta peptídica es uno o más péptidos seleccionados de los descritos en la Tabla 2. La cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo modificado (o su fragmento) puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más etiquetas de proteínas en sus bucles estructurales. En una realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados contienen 2, 4, 6, 8 o más etiquetas de proteínas en sus bucles estructurales. En otra realización, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es Sfp, AcpS, PPTasa de *T. maritima*, PPTasa humana, o una forma mutante de la misma que retiene la actividad de la 4'-fosfopanteteiniltransferasa. En una realización, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa se origina a partir de *Homo sapiens*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima*, *Clostridium thermocellum*, así como cualquier otro genoma de mamíferos, bacterias o hongos. En una realización específica, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es Sfp y la etiqueta del péptido se selecciona de GDSLWLLRLLN (SEQ ID NO: 1), GDSLWLL (SEQ ID NO: 2), DSLEFIASKLA (SEQ ID NO: 9), GDSLDMLEWSLM (SEQ ID NO: 10), DSLEFIASKL (SEQ ID NO: 18) y DSLEFIASK (SEQ ID NO: 19). En una realización, el anticuerpo

parental es un anticuerpo IgG, IgM, IgE o IgA. En una realización específica, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG1. En otra realización específica, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG2, IgG3 o IgG4.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos que comprenden una etiqueta peptídica que es un sustrato de una 4'-fosfopanteteinil transferasa, y en la que dicha etiqueta peptídica se inserta entre las posiciones 2 y 3 del dominio V_H, posiciones 63 64 del dominio V_H, posiciones 64 y 65 del dominio V_H, posiciones 138 y 139 del dominio CH1, posiciones 197 y 198 del dominio CH1, posiciones 359 y 360 del dominio CH3, posiciones 388 y 389 del dominio CH3, el extremo C- del dominio CH3 (después de Lys447), y/o las posiciones 2 y 3 del dominio V_L de un anticuerpo parental o fragmento del mismo. En otro aspecto, la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 110 y 111 de la cadena ligera, o entre 119 y 120, o entre 120 y 121, o entre 135 y 136, o entre 136 y 137, o entre 138 y 139, o entre 165 y 166 del dominio CH1, o entre 388 y 389 del dominio CH3 de un anticuerpo parental o fragmento del mismo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo modificado o fragmento del mismo que comprende SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:130 y/o SEQ ID NO:131. En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo modificado o fragmento del mismo que comprende SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:267, SEQ ID NO:268, SEQ ID NO:277, SEQ ID NO:356, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:365, SEQ ID NO:367, SEQ ID NO:373, SEQ ID NO:374, SEQ ID NO:380, o SEQ ID NO:384. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo modificado o fragmento del mismo que comprende SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:268, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:365, SEQ ID NO:367, SEQ ID NO:374, o SEQ ID NO:384.

En un aspecto, dicha etiqueta peptídica es uno o más péptidos seleccionados de los descritos en la Tabla 2. La cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo (o su fragmento) puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más etiquetas de proteínas en sus bucles estructurales. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contienen 2, 4, 6, 8 o más etiquetas de proteínas en sus bucles estructurales. En algunas realizaciones, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es Sfp, AcpS, PPTasa de *T. maritima*, PPTasa humana, o una forma mutante de la misma que retiene la actividad de la 4'-fosfopantetilenotransferasa. En algunas realizaciones, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa se origina a partir de *Homo sapiens*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima*, *Clostridium thermocellum*, así como cualquier otro genoma de mamíferos, bacterias o hongos. En una realización específica, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es Sfp y la etiqueta del péptido se selecciona de GDSLSWLLRLLN (SEQ ID NO: 1), GDSLSWL (SEQ ID NO: 2), DSLEFIASKLA (SEQ ID NO: 9), GDSLDMLEWSLM (SEQ ID NO: 10), DSLEFIASKL (SEQ ID NO: 18) y DSLEFIASK (SEQ ID NO: 19). En algunas realizaciones, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG, IgM, IgE o IgA. En una realización específica, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG2, IgG3 o IgG4.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos que comprenden una etiqueta peptídica que es un sustrato de una 4'-fosfopanteteinil transferasa, y en la que dicha etiqueta peptídica se inserta en un bucle estructural, o extremo C- o N- del anticuerpo o fragmento del mismo. En algunos aspectos, dicha etiqueta peptídica se inserta en las posiciones de aminoácidos de 62 a 64 del dominio V_H (mutaciones en los aminoácidos 62 y 63, y la inserción de la unidad estructural de la etiqueta peptídica entre los aminoácidos 63 y 64), en el aminoácido posiciones de 62 a 65 del dominio V_H (mutaciones en los aminoácidos 62-64, y inserción de la unidad estructural de la etiqueta peptídica entre los aminoácidos 64 y 65); en las posiciones de aminoácidos de 133 a 139 del dominio CH1 (mutaciones de los aminoácidos 133-138, y la inserción de la unidad estructural de la etiqueta peptídica entre los aminoácidos 138-139), posiciones de aminoácidos de 189 a 195 del dominio CH1, y/o posiciones de aminoácidos de 190 a 198 del dominio CH1 (mutaciones de los aminoácidos 190-197, y la inserción de la unidad estructural de la etiqueta peptídica entre 197 y 198) de un anticuerpo parental o fragmento del mismo. En un aspecto de la divulgación, dicha etiqueta peptídica es uno o más péptidos seleccionados de los descritos en la Tabla 2. La cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo modificado (o su fragmento) puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más etiquetas de proteínas en sus bucles estructurales. En un aspecto de la divulgación, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados contienen 2, 4, 6, 8 o más etiquetas de proteínas en sus bucles estructurales. En otra realización, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es Sfp, AcpS, PPTasa de *T. maritima*, PPTasa humana, o una forma mutante de la misma que retiene la actividad de la 4'-fosfopanteteiniltransferasa. En un aspecto de la divulgación, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa se origina en *Homo sapiens*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima*, *Clostridium thermocellum*, así como cualquier otro genoma de mamífero, bacteriano o micótico. En algunos aspectos de la divulgación, dicha 4'-fosfopanteteinil transferasa es Sfp y la etiqueta del péptido se selecciona de GDSLSWLLRLLN (SEQ ID NO: 1), GDSLSWL (SEQ ID NO: 2), DSLEFIASKLA (SEQ ID NO: 9), GDSLDMLEWSLM (SEQ ID NO: 10), DSLEFIASKL (SEQ ID NO: 18) y DSLEFIASK (SEQ ID NO: 19). En una realización, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG, IgM, IgE o IgA. En una realización específica, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo parental es un anticuerpo IgG2, IgG3 o IgG4.

En ciertos aspectos, la divulgación se refiere a anticuerpos modificados diseñados para contener uno o más sitios de conjugación ortogonales. Dichos sitios de conjugación ortogonales incluyen, pero no se limitan a, un sustrato de Sfp 4'-fosfopanteteinil transferasa, un sustrato de AcpS 4'-fosfopanteteinil transferasa, *T. maritima* 4'-fosfopanteteinil transferasa, 4'-fosfopanteteinil transferasa humana, a lisina, una cisteína, una tirosina, una histidina, un aminoácido no natural, pirrolisina y pirrolina-carboxi-lisina. Los sitios de conjugación ortogonal también pueden ser secuencias peptídicas que pueden modificarse enzimática o químicamente, por ejemplo, una etiqueta de tetracisteína, un péptido LPXTG-sortasa (SEQ ID NO: 1057) (X es cualquier aminoácido), un péptido aceptor de biotina, una etiqueta CXPXR de aldehído (SEQ ID NO: 1058) (X es cualquier aminoácido), o una etiqueta de His. En ciertos aspectos, dichos anticuerpos diseñados se marcan utilizando los métodos de la invención en combinación con otros métodos de conjugación conocidos en la técnica, que incluyen, entre otros, conjugación quimioselectiva a través de cisteína, lisina, histidina, tirosina, formilglicina, pirrolisina, pirrolina-carboxilisina y aminoácidos no naturales.

En ciertos aspectos, las enzimas Sfp y AcpS se utilizan para la marcación ortogonal específica del sitio de la misma o dos marcas diferentes en un anticuerpo diseñado para contener un péptido de la serie S (por ejemplo, S1, S2, S3, S4, S5, S6 y S7) y un péptido de la serie A (por ejemplo, A1, A-1, A-2, A-3, A-4 y A-6) ubicado en VH, VL, CH1, CH2, CH3, o región CL del anticuerpo (véase también Tabla 2).

En otros aspectos, las enzimas Sfp y AcpS se utilizan para la marcación ortogonal específica del sitio de dos marcas diferentes en un anticuerpo diseñado para contener un péptido de la serie ybbR (por ejemplo, ybbR11, ybbR12 y ybbR13) y un péptido de la serie A (para por ejemplo, A1, A-1, A-2, A-3, A-4 y A-6) ubicadas en la región CH1, CH2, CH3 o CL del anticuerpo.

En otros aspectos, las enzimas Sfp o AcpS se usan para la marcación ortogonal específica del sitio en un anticuerpo diseñado para contener un péptido de la serie ybbR (por ejemplo, ybbR11, ybbR12 y ybbR13) y un péptido de la serie A (por ejemplo, A1, A-1, A-2, A-3, A-4 y A-6) ubicadas en las regiones VH, VL, CH1, CH2, CH3 o CL del anticuerpo en combinación con otros métodos de conjugación. Tales métodos incluyen pero no se limitan a la conjugación con lisina, cisteína, tirosina, histidina, formilglicina, aminoácidos no naturales, pirrolisina y/o pirrolina-carboxi-lisina. Dichos métodos pueden usarse para unir los mismos o diferentes marcadores que los utilizados para la conjugación enzimática a través de Sfp o AcpS.

Proteínas que tienen actividad de 4'-fosfopanteteinil transferasa y sustratos peptídicos

Como se usa en el presente documento, los términos "4'-fosfopanteteinil transferasa" (PPTasas) y "proteína que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil transferasa" se utilizan de manera intercambiable y se refieren a cualquier proteína o un fragmento de la misma, que es capaz de transferir un grupo ppan de una molécula donante, como la coenzima A (CoA) o un análogo de la misma, a un sustrato, como una etiqueta peptídica o una proteína portadora de acilo.

Las PPTasas son enzimas que catalizan la modificación postraducción de las proteínas transportadoras asociadas con las sintasas de ácidos grasos (FAS), las sintasas de policétidos (PKS) y las sintetasas peptídicas no ribosómicas (NRPS). Estas proteínas portadoras se denominan comúnmente ACP, proteínas portadoras de acilo (FAS y PKS) o como PCP, proteínas portadoras de peptidilo (NRPS). Las ACP y las PCP constan de aproximadamente 80 aminoácidos y generalmente se integran como dominios en complejos de multienzimas FAS, PKS o NRPS. En algunos casos, las ACP y las PCP también se encuentran como proteínas independientes plegadas de forma autónoma. La ACP es esencial para la biosíntesis de ácidos grasos y policétidos, ya que lleva los intermediarios metabólicos correspondientes a través de la unión covalente a su grupo protésico ppan flexible. La PCP lleva a cabo la función análoga en la síntesis de péptidos no ribosómicos al transportar intermedios de péptidos entre sitios activos en complejos de multienzimas NRPS. Las PPTasas se han clasificado en tres grupos, según la secuencia y la similitud estructural y la especificidad del sustrato. Los miembros del primer grupo de PPTasas, por ejemplo, AcpS de *Escherichia coli*, tienen una longitud de aproximadamente 120 aminoácidos, funcionan como homotrímeros y tienen especificidades de sustrato bastante estrechas limitadas, por ejemplo, a las proteínas transportadoras de acilo (ACP) de tipo II sistemas FAS y PKS. Los miembros del segundo grupo, ejemplificados por Sfp de *Bacillus subtilis* o la PPTasa humana, funcionan como monómeros, y se ha informado que tienen amplias especificidades de sustrato que incluyen proteínas portadoras asociadas con PNR, FAS y PKS. (véase, por ejemplo, Suo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 99-104, 2001; Quadri et al., Biochem., 37: 1585-95, 1998; Liu et al., Arch. Microbiol., 183: 37-44, 2005; Joshi et al., J. Biol. Chem., 278: 33142-33149, 2003). El tercer grupo incluye PPTasas que se unen covalentemente a los FAS de tipo I, como los asociados con el FAS citosólico de levadura. (véase, por ejemplo, Fichtlscherer et al., Eur. J. Biochem., 267: 2666-71, 2000).

Según la presente invención, las PPTasas incluyen proteínas de origen natural que tienen actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa, que incluyen pero no se limitan a, AcpS de *E. coli* (PPTasa de tipo I) y Sfp de *B. subtilis* (PPTasa de tipo II), dominios PPTasa integrados (PPTasa tipo III) asociados con ácidos grasos sintasas (FAS) de *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans*, *E. nidulans* y *P. patulum*, EntD de *E. coli*, *S. flexneri*, *S. typhimurium* y *S. austin*, Psf-1 de *B. pumilus*, Gsp de *B. brevis*, HetI de *Anabaena* sp., Lys5 de *S. cerevisiae*, Lpa-14 de *B. subtilis* y 0195 de *E. coli*, PPTasa (NP_228501) de *T. maritima* MSB8, PPTasa (NP_056238) de *Homo sapiens*, y homólogos y mutantes de los mismos. Las PPTasas de la presente invención también incluyen proteínas que tienen actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa de especies distintas a las descritas anteriormente, así como aquellas proteínas producidas artificial o

recombinantemente, que son capaces de 4'-fosopanteteinilación de una unidad estructural peptídico descrito en el presente documento.

Sfp y AcpS representan dos clases de 4'-fosopanteteinil transferasas que muestran diferencias tanto en su especificidad de sustrato para los dominios de proteína transportadora como en sus estructuras (Flugal et al., J. Biol. Chem., 275: 959-968, 2000; Lambalot et al., Chem. Biol., 3: 923-936, 1996). La clase Sfp de las PPTasas pseudodiméricas tiene un tamaño de aproximadamente 230 residuos y la estructura cristalina de Sfp sugiere que tiene una simetría doble con las mitades N- y C- del extremo de la molécula que adopta pliegues similares, con el sitio activo de la enzima en la interfaz (Hodneland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 5048-5052, 2002; Koglin et al., Science, 312: 273-276, 2006). En contraste, AcpS tiene una longitud de aproximadamente 120 residuos, aproximadamente la mitad del tamaño de Sfp, y las estructuras cristalinas de AcpS muestran que la enzima se ensambla en trímeros y que los sitios de unión de ACP y CoA se forman en la interfaz entre cada monómero (Reuter et al., Embo. J., 18: 6823-6831, 1999; Chirgadze et al., Embo. J., 19: 5281-5287, 2000). Se ha informado que Sfp exhibe una especificidad de sustrato mucho más amplia que AcpS, ya que Sfp puede modificar los dominios PCP y ACP de péptidos sintéticos no ribosomales, policétidos sintasas y sintasas de ácidos grasos, mientras que AcpS modifica solo ACP (Flugal et al., J. Biol. Chem., 275: 959-968, 2000; Parris et al., Structure, 8: 883-895, 2000; Mofid et al., J. Biol. Chem., 277: 17023-17031, 2002).

Los sustratos ACP y PCP de ambos tipos de PPTasas adoptan pliegues similares a los de las proteínas de haz de cuatro hélices, y el grupo protésico ppan modifica el residuo de serina en la parte superior de la segunda hélice alfa, que se ha demostrado que desempeña un papel importante para interactuar con Sfp y AcpS (Hodneland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 5048-5052, 2002; Chirgadze et al., Embo. J., 19: 5281-5287, 2000; Quadri et al., Biochem., 37: 1585-1595, 1998; Li et al., Biochem., 42: 4.648 a 4.657, 2003). Aunque no existe una diferencia de secuencia de consenso obvia entre PCP y ACP, la diferencia más significativa entre los dos es el potencial de superficie electrostática de las proteínas portadoras, con una superficie de proteína neutra para PCP y una superficie ácida cargada negativamente para los dominios de ACP en FAS y sistemas PKS (Parris et al., Structure, 8: 883-895, 2000).

Los grupos de péptidos cortos se han identificado como sustratos eficaces para las PPTasas. Por ejemplo, ybbR13 es un péptido de 11 aminoácidos, que es un sustrato de Sfp (J. Yin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102: 15815-15820, 2005; Z. Zhou et al., ACS Chem Biol., 2: 337-346, 2007; Z. Zhou et al., J. Am. Chem. Soc., 130: 9925-9930, 2008). El péptido ybbR13 (DSLEFIASKLA (SEQ ID NO: 9)) se aisló de una biblioteca de fagos del genoma de B. subtilis (J. Yin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102: 15815-15820, 2005). Una parte de la secuencia del péptido ybbR13 se deriva de un marco de lectura abierto de B. subtilis, llamado ybbR, e incluye la secuencia tripéptido (H/D)S(L/I) en el extremo N-, que es conservado en sustratos conocidos de PPTasas, tales como ACP, PCP y proteínas portadoras de arilo (ArCP). El péptido ybbR no incluye la secuencia de aminoácidos, DxFFxxLGG (SEQ ID NO: 1059) en su extremo N-, que se encuentra conservada en los PCP. Se han descrito modificaciones y variantes del péptido ybbR13 que se pueden usar como sustratos en las reacciones de 4'-fosopantoetilación para el marcado específico del sitio (J. Yin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102: 15815-15820, 2005). Los sustratos peptídicos adicionales para las PPTasas son la serie S de péptidos y la serie A de péptidos, designados como "S" o "A" en función de su reactividad con Sfp o AcpS, respectivamente (Z. Zhou et al., ACS Chem Biol., 2: 337-346, 2007 y Z. Zhou et al., J. Am. Chem. Soc., 130: 9925 a 9930, 2008). Las series de péptidos S de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, S6, que es un sustrato eficaz para Sfp, y una serie de péptidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, A1, que es un sustrato eficaz para AcpS. Los péptidos tanto S6 como A1 tienen una longitud de 12 residuos de aminoácidos.

En la Tabla 2 a continuación se enumeran ejemplos de sustratos peptídicos. De acuerdo con la presente invención, estas etiquetas peptídicas cortas pueden usarse para la marcación específica del sitio de proteínas diana (incluyendo anticuerpos) en reacciones catalizadas por PPTasas. Además, un par de etiquetas peptídicas y las respectivas PPTasas descritas en este documento, por ejemplo, ybbR13/Sfp o S6/Sfp y A1/AcpS, también se puede utilizar para la marcación ortogonal específica del sitio de una (o múltiples) proteínas diana, por ejemplo, en lisados celulares o en la superficie de células vivas.

Tabla 2. Ejemplos de sustrato peptídico de PPTasa. El residuo de serina modificado está subrayado.

Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre
GD <u>S</u> LSWLLRLLN	1	S6
GD <u>S</u> LSWL	2	S6 truncado
GD <u>S</u> LSWLVRCLN	3	S1
GD <u>S</u> LSWLLRCLN	4	S2

Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre
GD <u>S</u> LSWLVRLLN	5	S3
GD <u>S</u> LSWLLRSLN	6	S7
GSQDVLD <u>S</u> LEFIASKLA	7	Ybbr11
VLD <u>S</u> LEFIASKLA	8	Ybbr12
D <u>S</u> LEFIASKLA	9	Ybbr13
GD <u>S</u> LDMLEWSLM	10	A1
GD <u>S</u> LDMLEWSL	11	A-1
GD <u>S</u> LDMLEWS	12	A-2
GD <u>S</u> LDMLEW	13	A-3
D <u>S</u> LDMLEW	14	A-4
GD <u>S</u> LDM	15	A-6
LD <u>S</u> VRMMALAAR	16	E0
LD <u>S</u> LDMLEWSLR	17	E2
D <u>S</u> LEFIASKL	18	ybbR truncado 1
D <u>S</u> LEFIASK	19	ybbR truncado 2
DVLD <u>S</u> LEFI	20	ybbR8
VLD <u>S</u> LEFIAS	21	ybbR14
DSLDMLEWSL	1132	A1 truncado

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona anticuerpos diseñados que contienen una o más de las etiquetas peptídicas enumeradas en la Tabla 2, y métodos para marcar tales anticuerpos, por ejemplo, conjugando con una citotoxina. La química de la marcación se ilustra a continuación y en los ejemplos.

5 2. Química de la marcación

El anticuerpo modificado o el fragmento del mismo proporcionado en el presente documento se marcan específicamente en el sitio mediante la modificación postraducción de la etiqueta peptídica corta (insertada) usando PPTasas o mutantes de los mismos, que incluyen, entre otros, Sfp, AcpS, PPTasa humana o PPTasa de *T. maritima*. Dichas modificaciones postraducción implican una reacción catalizada por PPTasa entre un residuo de serina conservado en la etiqueta peptídica corta y un grupo 4'-fosfopanteteinil (ppan) de coenzima A (CoA) o un análogo de coenzima A. En esta reacción, el grupo protésico ppan de CoA, o grupo protésico ppan modificado del análogo de CoA, se une a la etiqueta peptídica corta a través de la formación de un enlace fosfodiéster con el grupo hidroxilo del residuo de serina conservado de la etiqueta peptídica corta que se ha incorporado (es decir, insertado o injertado o una combinación de los mismos) en el anticuerpo. El ppan o ppan modificado está unido a un grupo terminal (TG) y la

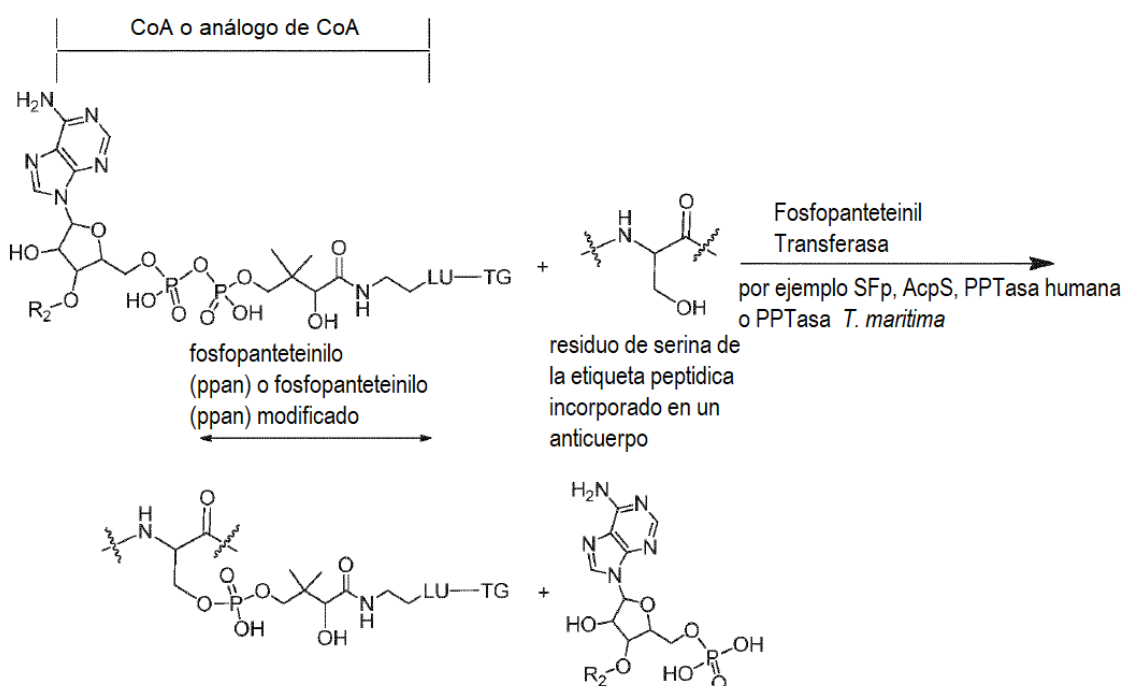
formación del enlace fosfodiéster conjuga el grupo terminal (TG) al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que incluye la unidad estructural ppan o ppan modificada.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos proporcionados en este documento se marcan mediante un método de una etapa en donde la modificación postraduccion se produce al hacer reaccionar un CoA unido a un grupo terminal (TG), o un análogo de CoA vinculado a un terminal grupo (TG), con la serina conservada de la etiqueta peptídica corta diseñada en el anticuerpo, como se muestra en los Esquemas (Ia)-(Ic) a continuación. Alternativamente, en otras realizaciones de la modificación postraduccion de los anticuerpos modificados o fragmento de los mismos proporcionados en el presente documento, los anticuerpos modificados o fragmento de los mismos se marcan mediante un método de dos etapas en donde la modificación postraduccion implica hacer reaccionar primero una CoA activada o un análogo de CoA con la serina conservada de la etiqueta peptídica corta diseñada en el anticuerpo, seguida de la reacción de un grupo terminal funcionalizado (TG) con el grupo reactivo en la CoA activada o una CoA activada. Estos métodos de dos etapas se ilustran en los Esquemas (IIa)-(IIf) más adelante. En otras realizaciones de la modificación postraduccion de los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos proporcionados en el presente documento, los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos se marcan mediante un método de tres etapas, en donde la modificación postraduccion implica hacer reaccionar primero una CoA que tiene un grupo protésico ppan protegido, o un análogo de CoA que tiene un grupo protésico ppan protegido, con la serina conservada de la etiqueta peptídica corta diseñada en el anticuerpo, uniendo así el análogo de CoA o CoA al anticuerpo. En el segundo paso, el grupo protésico ppan protegido se desprotege generando así un grupo funcional reactivo en el grupo protésico ppan protegido. En la tercera etapa, este grupo funcional reactivo está vinculado a un grupo terminal (TG), uniendo así el grupo terminal al anticuerpo modificado o fragmento del mismo. Tales métodos de tres etapas se ilustran en los Esquemas (IIIa)-(IIIf) más adelante.

Método de un paso

El método de un solo paso utilizado para marcar los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos que se proporcionan aquí se muestra en el Esquema (Ia):

Esquema (Ia)



dónde:

R₂ es H o -P(=O)(OH)₂;

La unidad enlazadora (LU) es un grupo químico que une el grupo terminal (TG) al grupo protésico ppan modificado del análogo de CoA y

el grupo terminal (TG) es un grupo farmacológico seleccionado de un agente anticanceroso, un agente antiinflamatorio, un agente antifúngico, un agente antibacteriano, un agente antiparasitario, un agente antiviral y un agente anestésico, una sonda biofísica, un fluoróforo, una sonda de afinidad, un quelante, una sonda espectroscópica, una sonda

radioactiva, una molécula lipídica, un polietilenglicol, un polímero, un marcador de giro, ADN, ARN, una proteína, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una nanopartícula, un punto cuántico, un liposoma, una partícula de PLGA, un polisacárido o una superficie.

- 5 En ciertas realizaciones, la unidad enlazadora (LU) comprende un enlazador seleccionado de entre un enlazador no escindible enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador enzimáticamente escindible, un enlazador fotoestable, un enlazador fotoescindible o cualquier combinación de los mismos, y la unidad enlazadora (LU) opcionalmente contiene un espaciador autoinmolante.

En ciertas realizaciones, la Unidad enlazadora (LU) es $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, en donde

- 10 L_1 es un enlace, un enlazador escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador escindible fotoeléctricamente;

L_2 es un enlace, un enlazador escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible;

L_3 es un enlace, un enlazador no escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible, y

- 15 L_4 es un enlace, un enlazador no escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable, un enlazador fotoescindible o un espaciador autoinmolable.

En ciertas realizaciones, la Unidad enlazadora (LU) es $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, en donde

L_1 es un enlazador no escindible enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible;

- 20 L_2 es un enlace, un enlazador escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible;

L_3 es un enlace, un enlazador no escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible, y

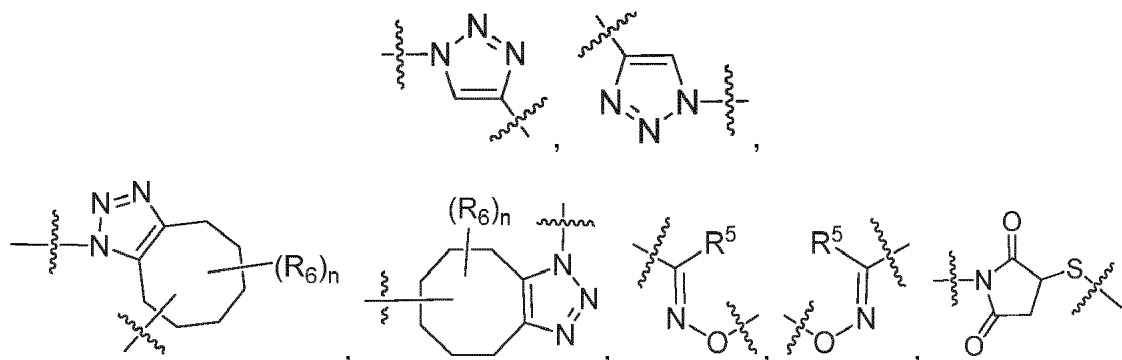
- 25 L_4 es un enlace, un enlazador no escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable, un enlazador fotoescindible o un espaciador autoinmolable.

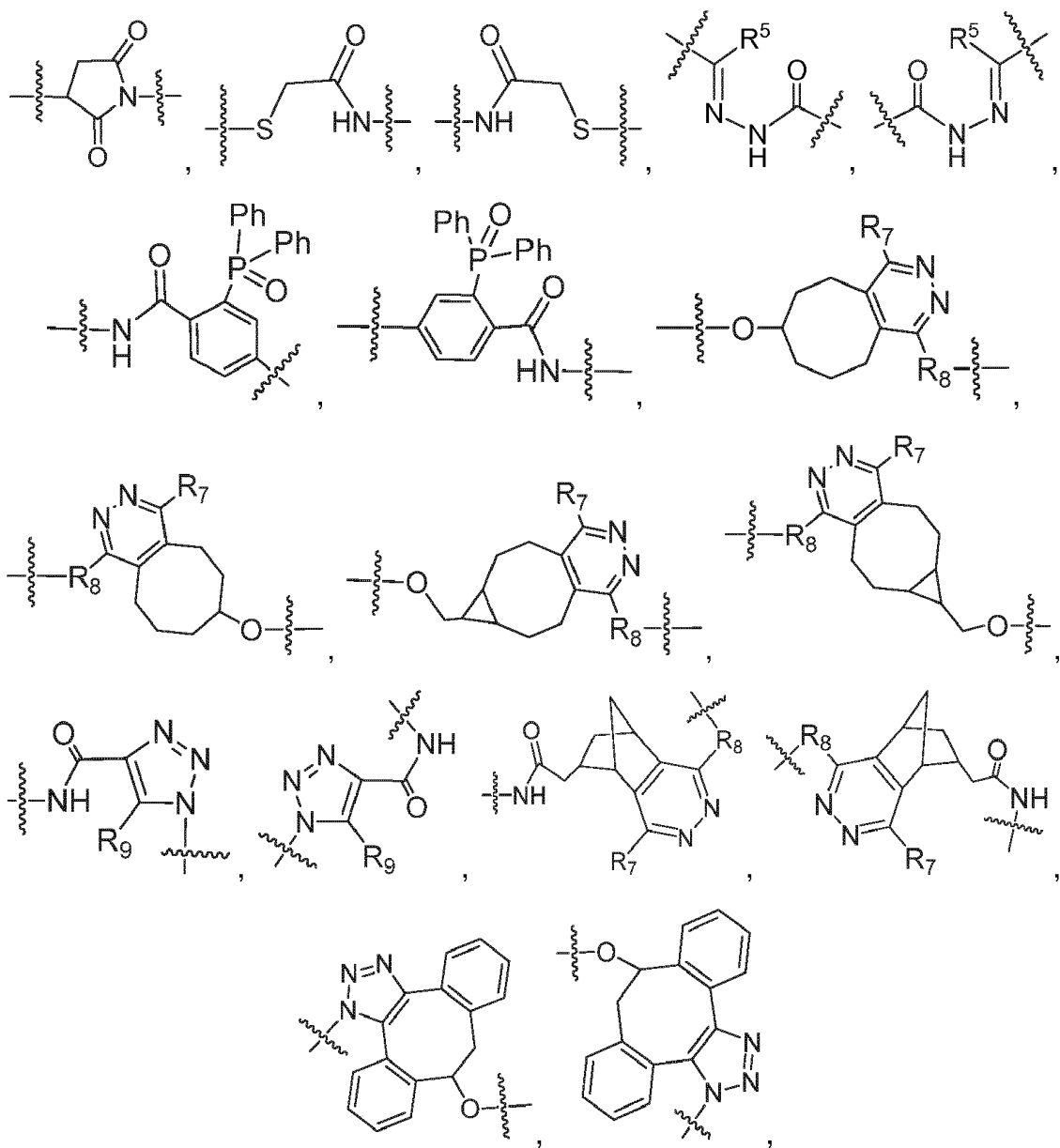
En ciertas realizaciones, la Unidad enlazadora (LU) es $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, en donde

L_1 es un enlace, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ o $-X^2-$; dónde:

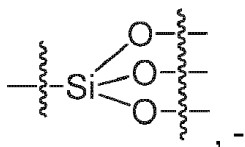
- 30 A_1 es $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m-$, $-(((C(R^4)_2)_nO)_m)-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$, $-S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, o $-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$;

cada X^2 se selecciona independientemente de un enlace,





-S-, -Si(OH)₂O-,


$$\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{NH}-, -\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})-, -\text{C}(=\text{O})\text{NH}- \text{ y } -\text{NHC}(=\text{O})-;$$

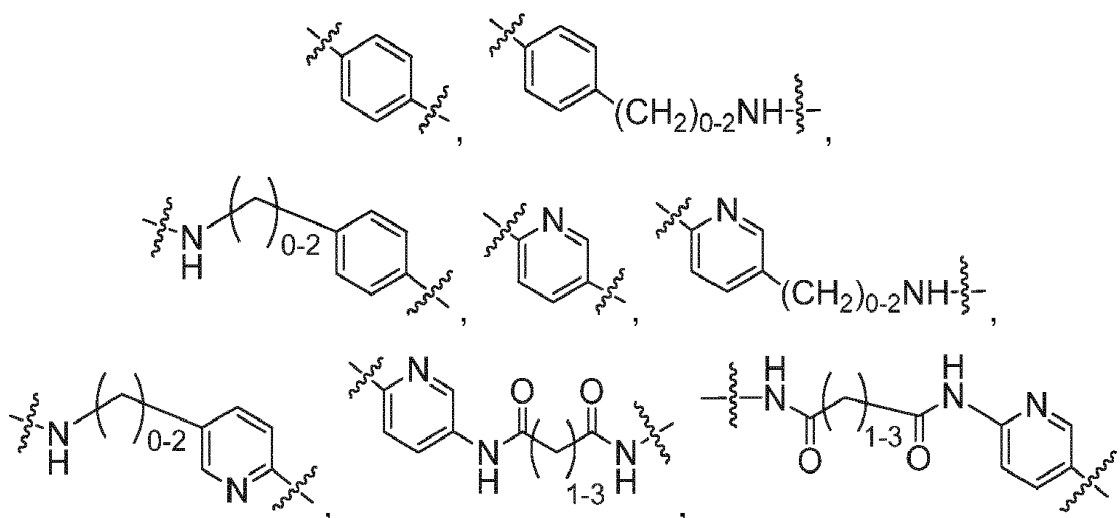
cada R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, -C(=O)OH y -OH,

10 cada R⁵ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, fenilo o alquilo C₁₋₄ sustituido con 1 a 3 grupos OH;

cada R⁶ se selecciona independientemente de H, flúor, benciloxi sustituido con -C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

R⁷ se selecciona independientemente de H, fenilo y piridina;

R^8 se selecciona independientemente de



R₉ se selecciona independientemente de H y haloalquilo C₁₋₆;

- 5 cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9;

L₂ es un enlace, un enlazador escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible;

- 10 L₃ es un enlace, un enlazador no escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible, y

L₄ es un enlace, un enlazador no escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable, un enlazador fotoescindible o un espaciador autoinmolable.

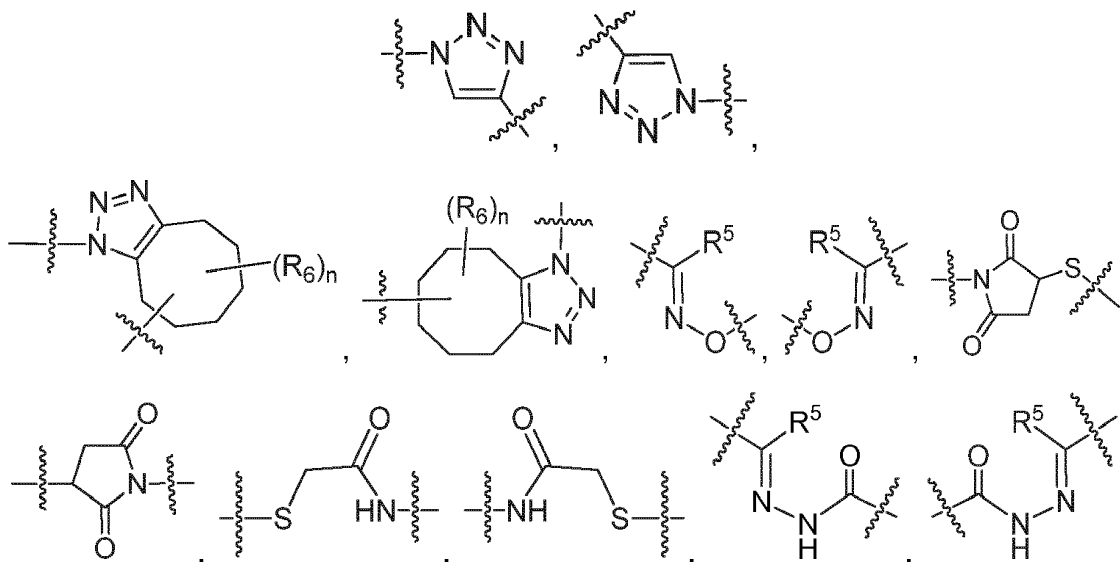
En ciertas realizaciones, L₁ es C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-CH₂CH₂-S-, por lo que LU es -C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-CH₂CH₂-S-L₂-L₃-L₄-.

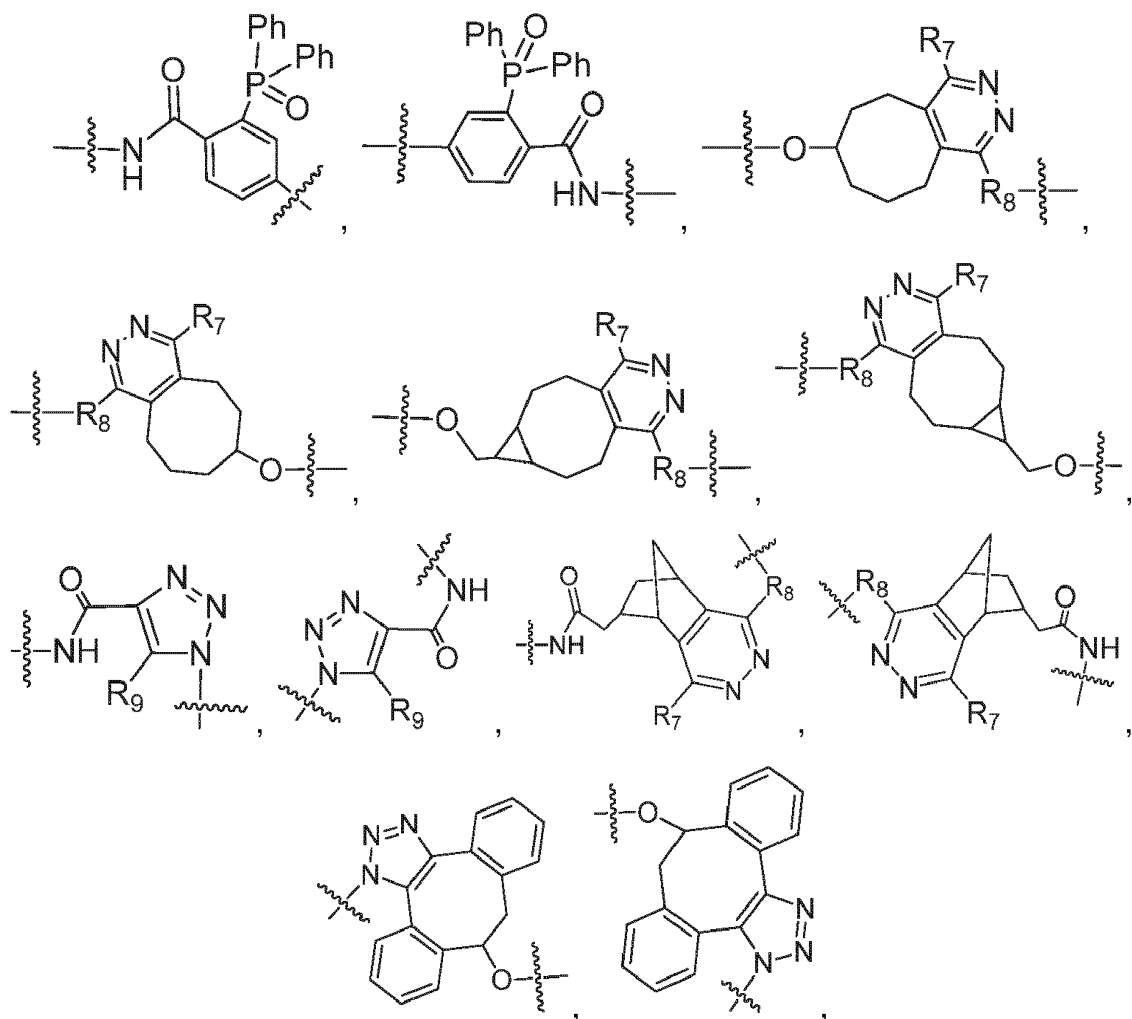
- 15 En ciertas realizaciones, la Unidad enlazadora (LU) es -L₁-L₂-L₃-L₄-, en donde

L₁ es un enlace, -A₁-, -A₁X²- o -X²-; dónde:

- 20 A₁ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, o -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-;

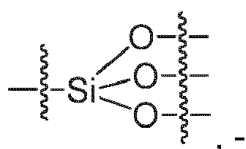
cada X² se selecciona independientemente de un enlace,





5

-S-, -Si(OH)₂O-,



CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH- y -NHC(=O)-;

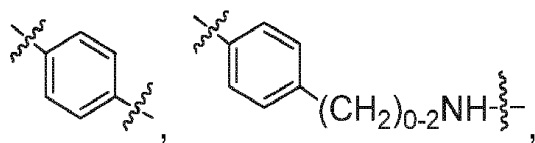
cada R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, -C(=O)OH y -OH,

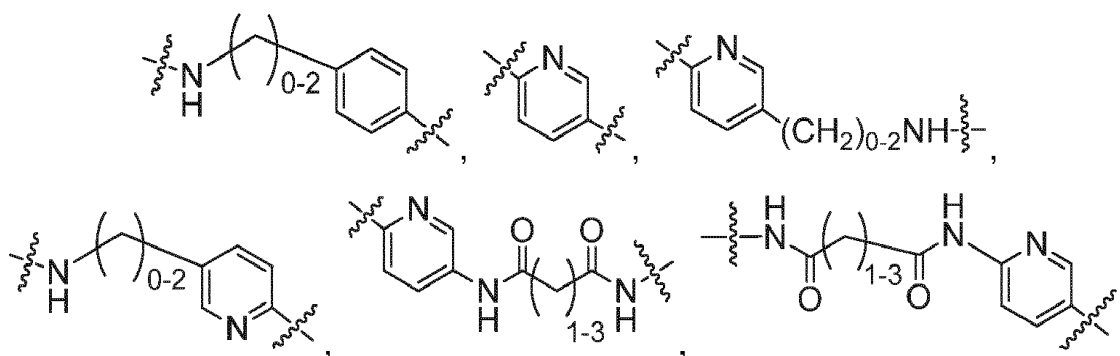
cada R⁵ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, fenilo o alquilo C₁₋₄ sustituido con 1 a 3 grupos OH;

10 cada R⁶ se selecciona independientemente de H, flúor, benciloxi sustituido con -C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

R₇ se selecciona independientemente de H, fenilo y piridina;

R₈ se selecciona independientemente de





R⁹ se selecciona independientemente de H y haloalquilo C₁₋₆;

cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y

5 cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9;

L₂ es un enlace, un enlazador escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible;

L₃ es un enlace, un enlazador escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador escindible fotoeléctricamente;

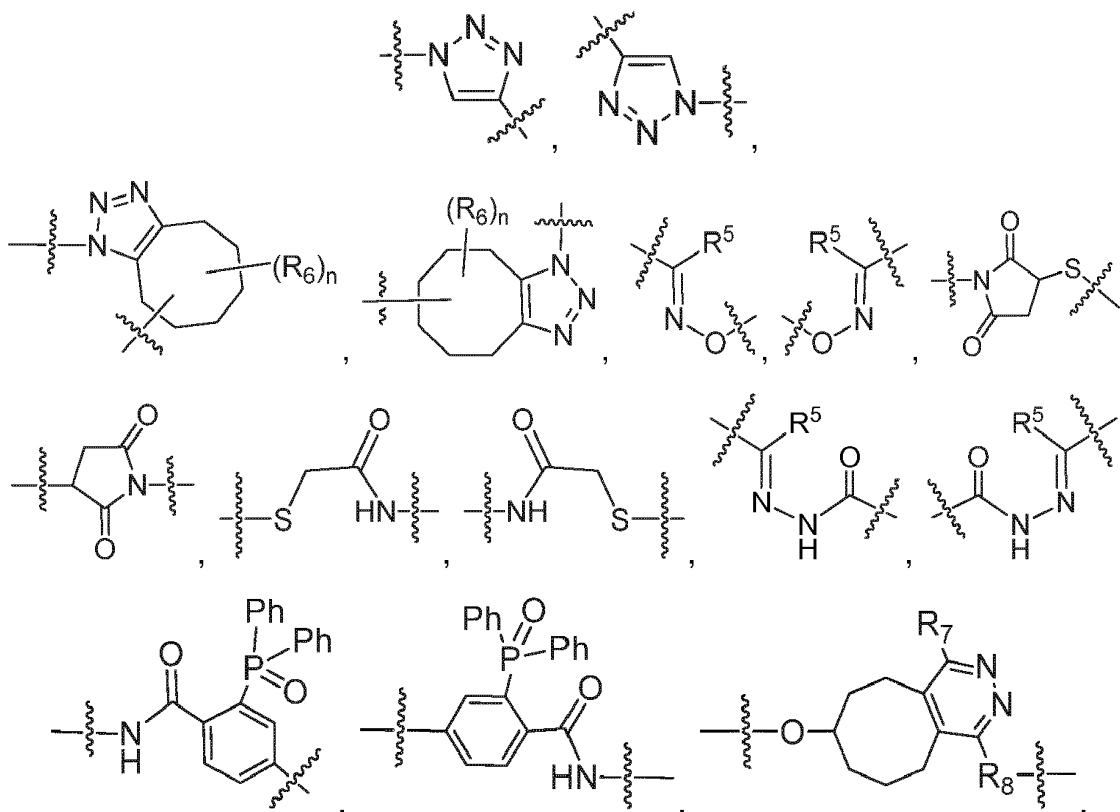
10 L₄ es un enlace, un enlazador no escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable, un enlazador fotoescindible o un espaciador autoinmolable.

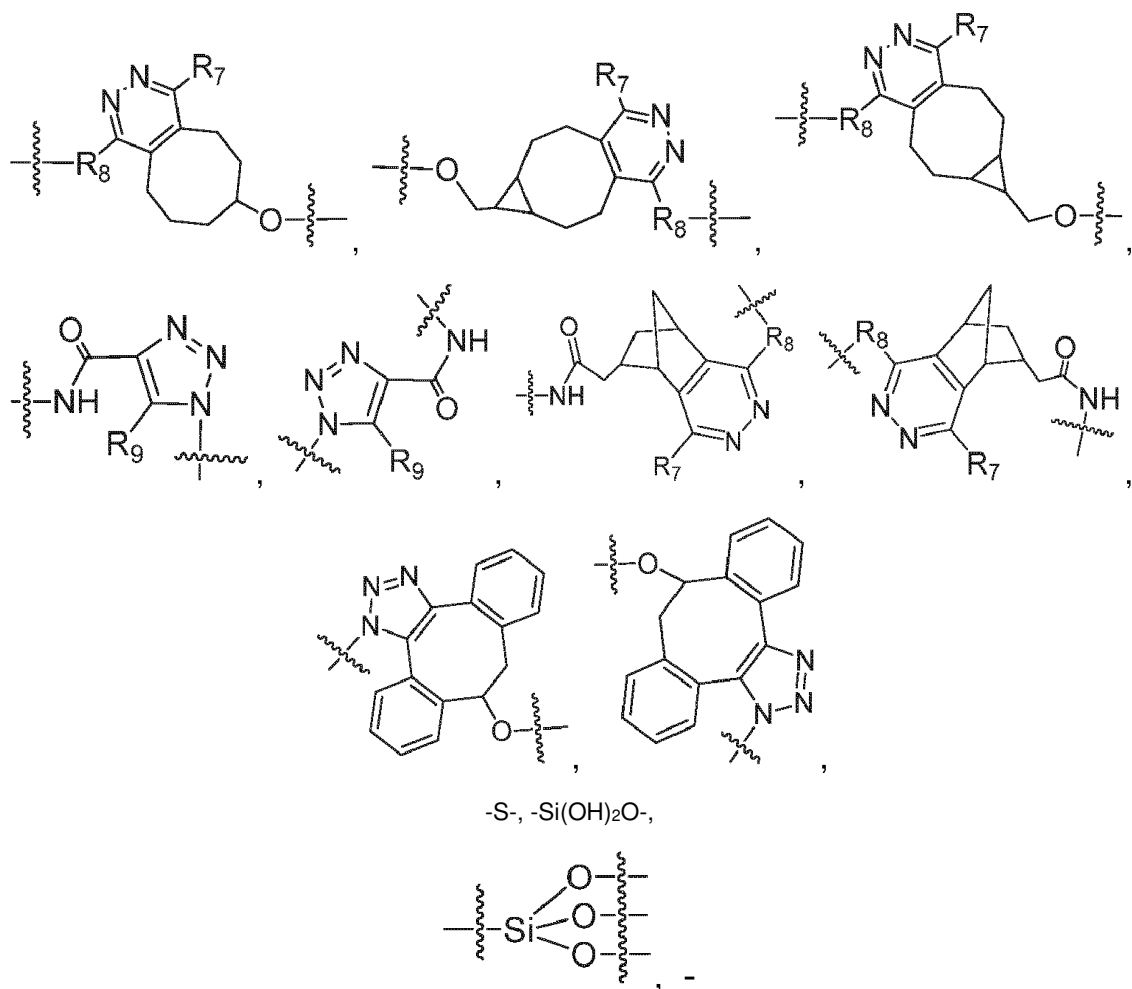
En ciertas realizaciones, la Unidad enlazadora (LU) es -L₁-L₂-L₃-L₄-, en donde

L¹ es un enlace, -A₁-, -A₁X²- o -X²-; dónde:

15 A₁ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -(O(CH₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n- o -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-;

cada X² se selecciona independientemente de un enlace,





5

CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH- y -NHC(=O)-;

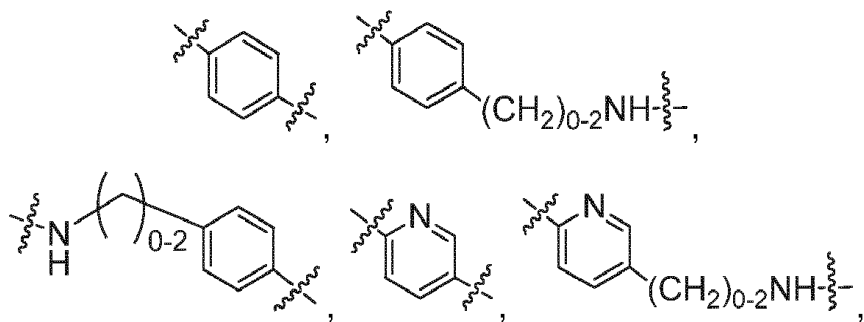
cada R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, -C(=O)OH y -OH,

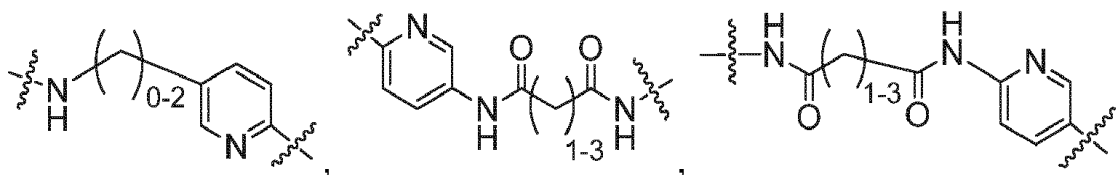
cada R⁵ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, fenilo o alquilo C₁₋₄ sustituido con 1 a 3 grupos OH;

10 cada R⁶ se selecciona independientemente de H, flúor, benciloxi sustituido con -C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

R⁷ se selecciona independientemente de H, fenilo y piridina;

R⁸ se selecciona independientemente de





R⁹ se selecciona independientemente de H y haloalquilo C₁₋₆;

cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y

cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9;

- 5 L₂ es un enlace, un enlazador escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible;

L₃ es un enlace, un enlazador no escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible, y

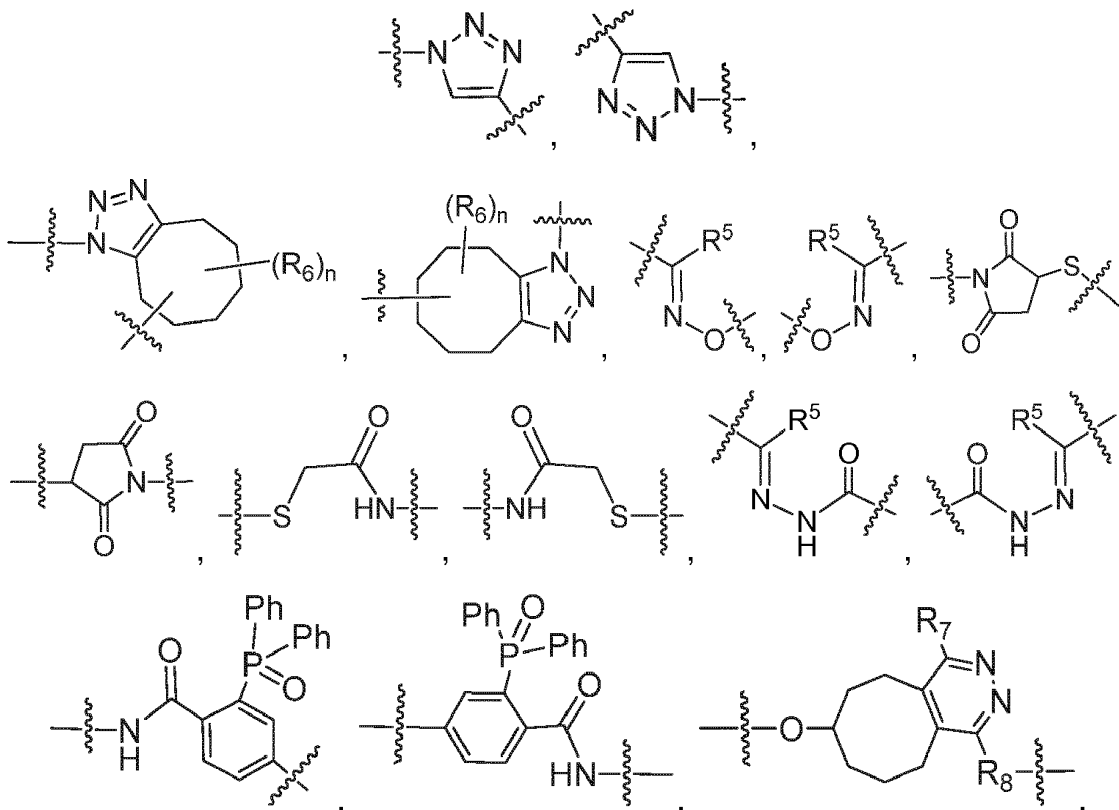
- 10 L₄ es un enlace, un enlazador no escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible, un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable, un enlazador fotoescindible o un espaciador autoinmolable.

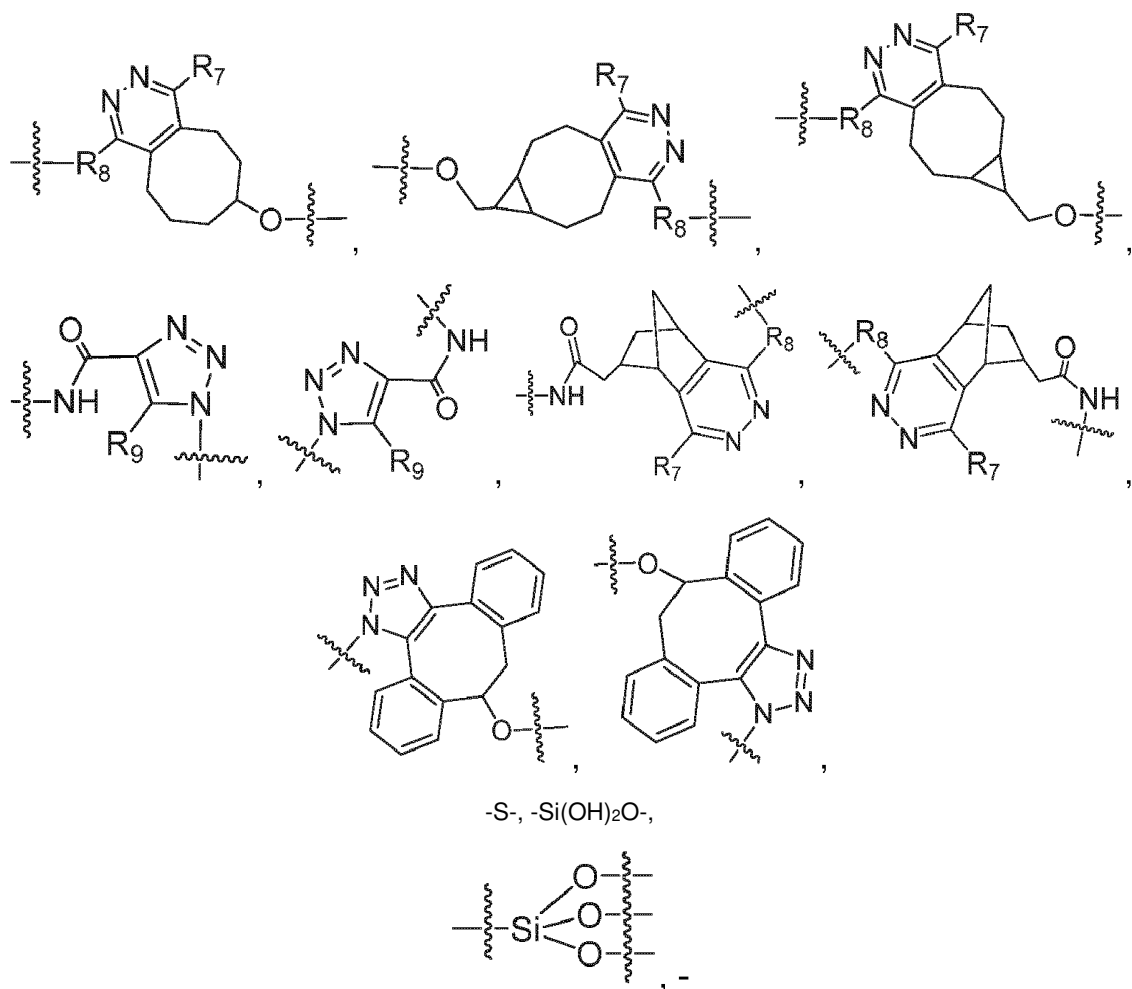
En ciertas realizaciones, la Unidad enlazadora (LU) es -L₁-L₂-L₃-L₄-, en donde

L₁ es un enlace, -A₁-, -A₁X²- o -X²-; dónde:

A₁ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -(O(CH₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n- o -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-;

- 15 cada X² se selecciona independientemente de un enlace,





5

CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH- y -NHC(=O)-;

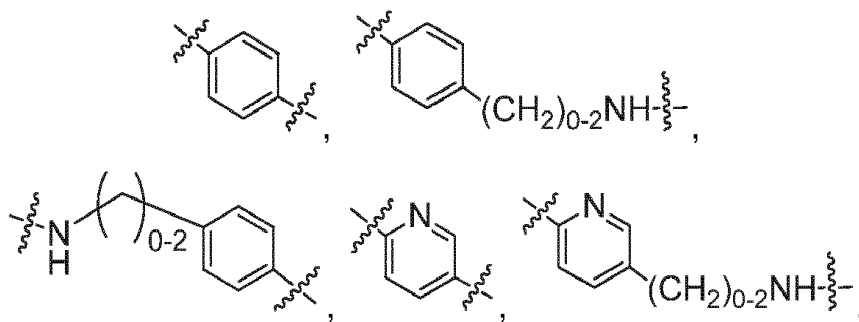
cada R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, -C(=O)OH y -OH,

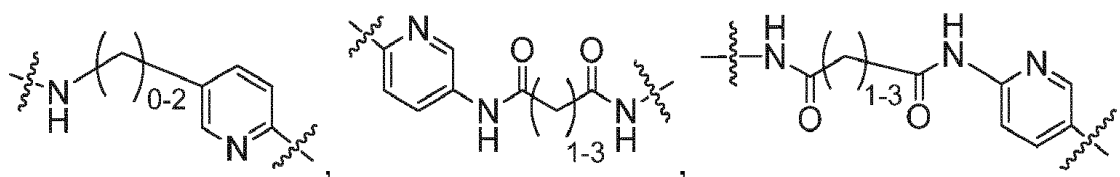
cada R⁵ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, fenilo o alquilo C₁₋₄ sustituido con 1 a 3 grupos OH;

10 cada R⁶ se selecciona independientemente de H, flúor, benciloxi sustituido con -C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

R⁷ se selecciona independientemente de H, fenilo y piridina;

R⁸ se selecciona independientemente de





R⁹ se selecciona independientemente de H y haloalquilo C₁₋₆;

cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y

cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9;

5 L₂ es un enlace, un enlazador no enzimáticamente escindible o un enlazador no escindible;

L₃ es un enlace, un enlazador no enzimáticamente escindible o un enlazador no escindible;

L₄ es un enlace, un enlazador escindible enzimáticamente o un espaciador autoinmolante.

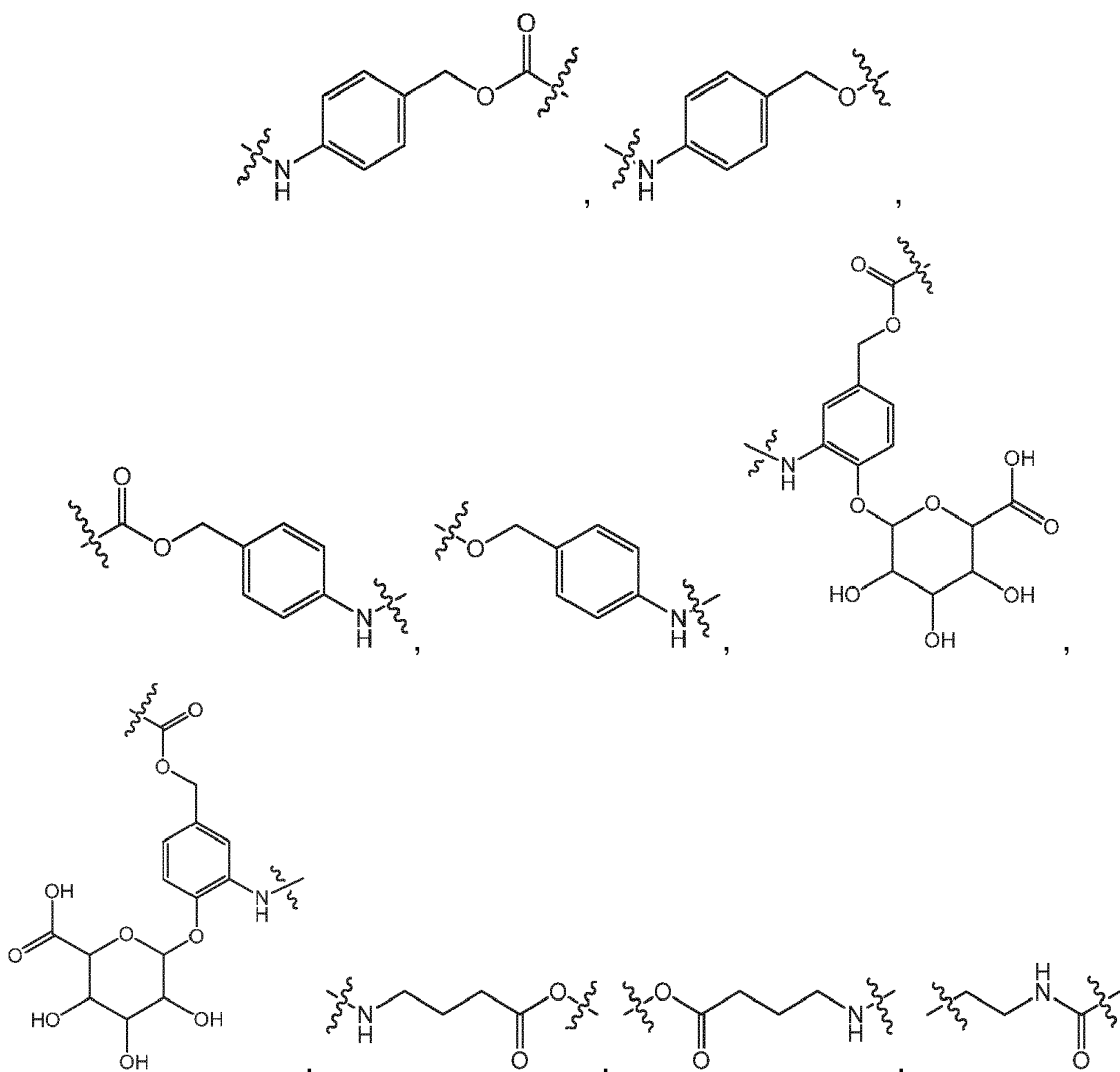
En ciertas realizaciones, la Unidad enlazadora (LU) es -L₁-L₂-L₃-L₄-, en donde

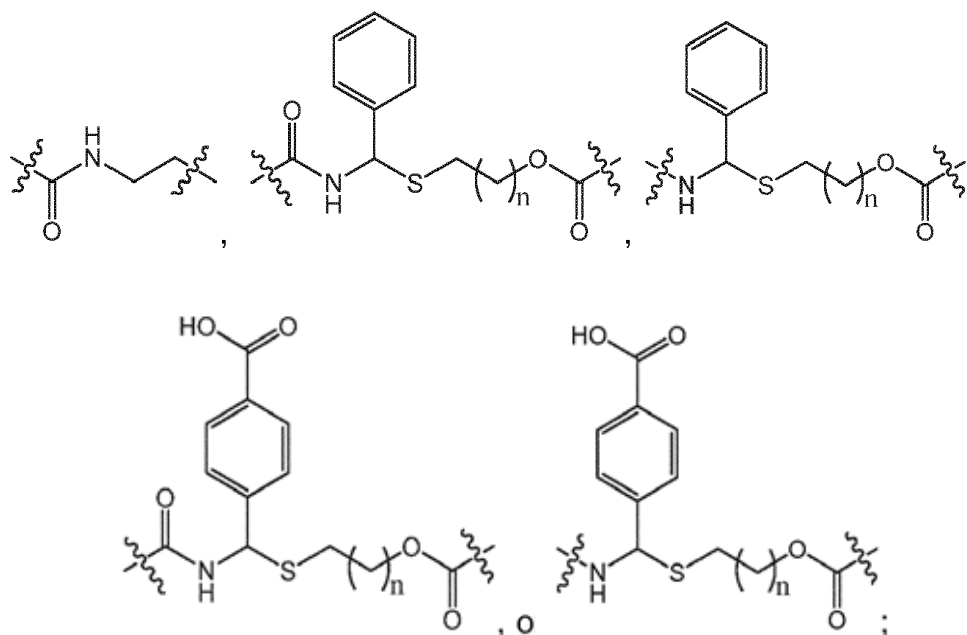
L₁ es un enlace, -A₁-, -A₁X²- o -X²-;

10 L₂ es un enlace, -A₂-, o -A₂X²-;

L₃ es un enlace, -A₃-, o -A₃X²-;

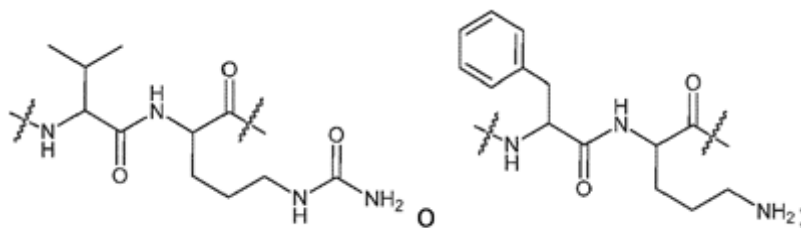
L₄ es un enlace, -A₄-, -A₄X²-,



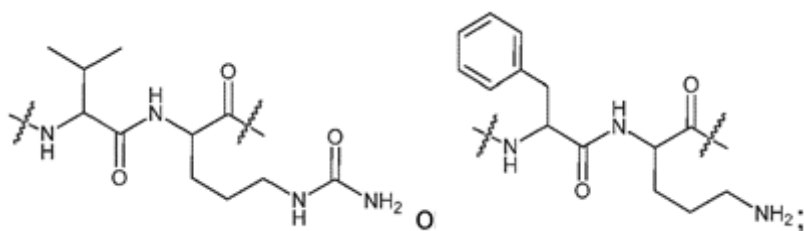


A₁ es -C(=O)NH-, -NHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-,
 5 -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-,
 -, (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-,
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 10 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

A₂ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-,
 -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NR⁴-, -(CH₂)_nNHC(=O)-,
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-,
 15 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nS-, -(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-,
 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)NH(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-,
 (O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

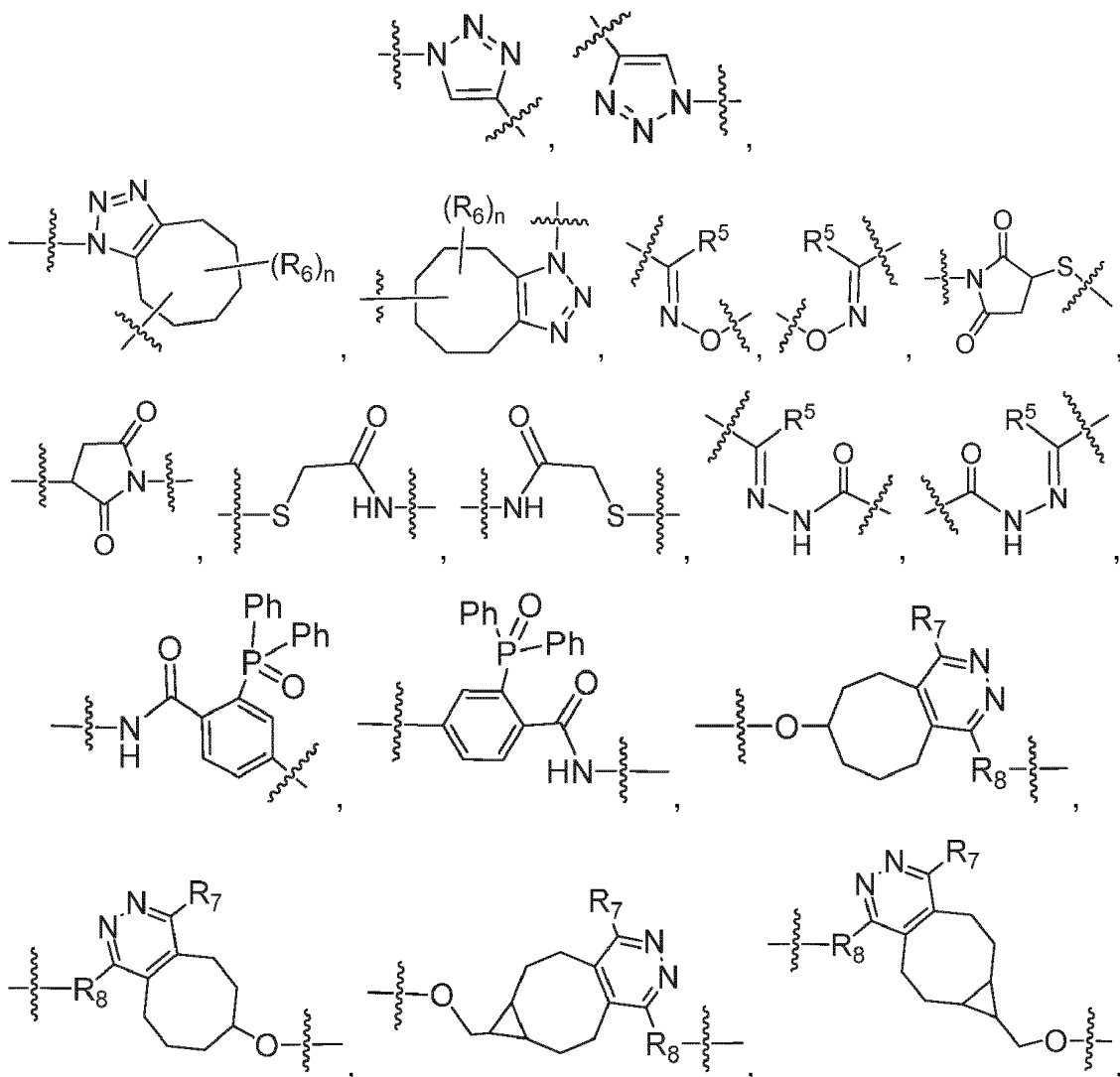


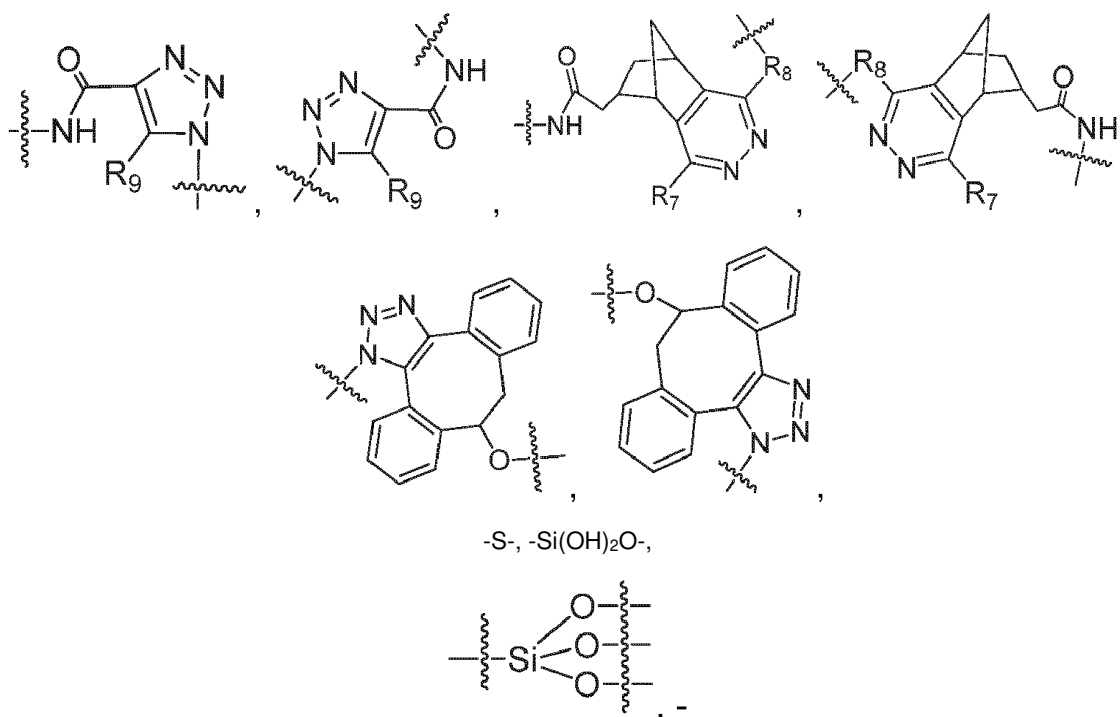
A₃ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-,
 -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-,
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-,
 25 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nS-, -(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-,
 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)NH(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)-,
 (C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mC(=O)-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;



A4 es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_nO(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nO(C(R⁴)₂)_nmNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -O(C(R⁴)₂)_nmNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-;

10 cada X^2 se selecciona independientemente de un enlace,





5 $\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ y $-\text{NHC}(=\text{O})-$;

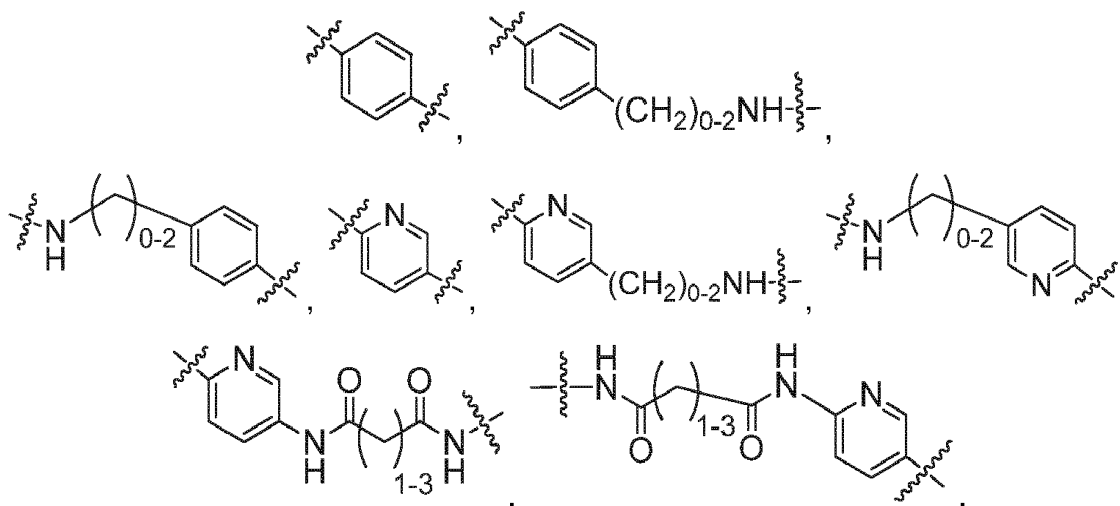
cada R^4 se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-4} , $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ y $-\text{OH}$,

cada R^5 se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-4} , fenilo o alquilo C_{1-4} sustituido con 1 a 3 grupos OH;

cada R^6 se selecciona independientemente de H, flúor, benciloxi sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, bencilo sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, alcoxi C_{1-4} sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ y alquilo C_{1-4} sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$;

10 R^7 se selecciona independientemente de H, fenilo y piridina;

R^8 se selecciona independientemente de



15 R^9 se selecciona independientemente de H y haloalquilo C_{1-6} ;

cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y

cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

En ciertas realizaciones, la Unidad enlazadora (LU) es $-\text{L}_1-\text{L}_2-\text{L}_3-\text{L}_4-$, en donde

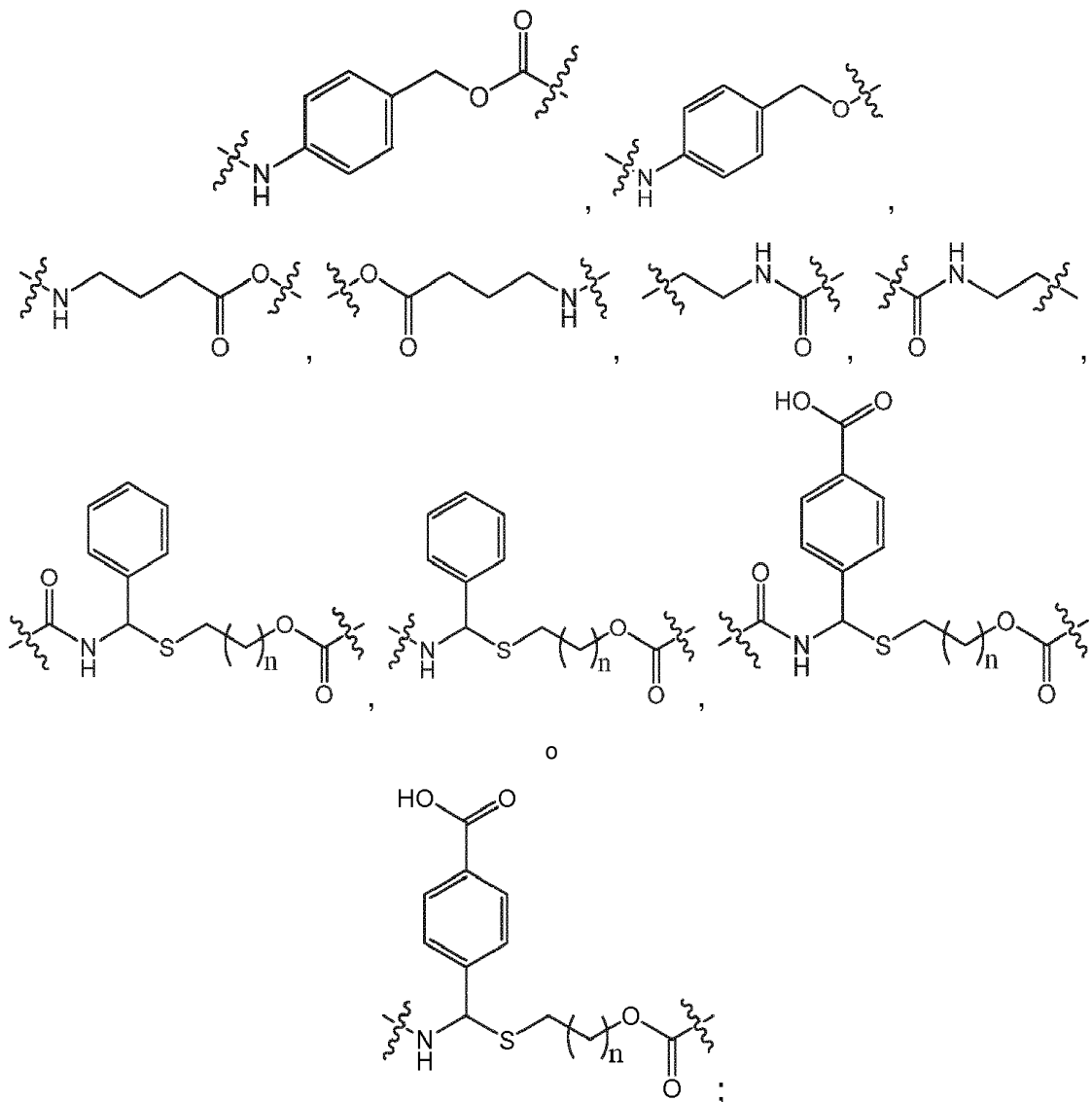
L_1 es un enlace, $-\text{A}_1-$, $-\text{A}_1\text{X}^2-$ o $-\text{X}^2-$;

L₂ es un enlace, -A₂-, o -A₂X²⁻;

L₃ es un enlace, -A₃-, o -A₃X²⁻;

L₄ es un enlace, -A₄-, -A₄X²⁻,

5



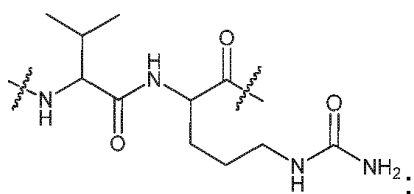
o

10

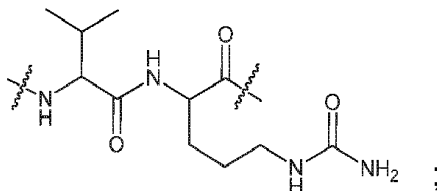
A₁ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n- o -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-;

15

A₂ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n- o



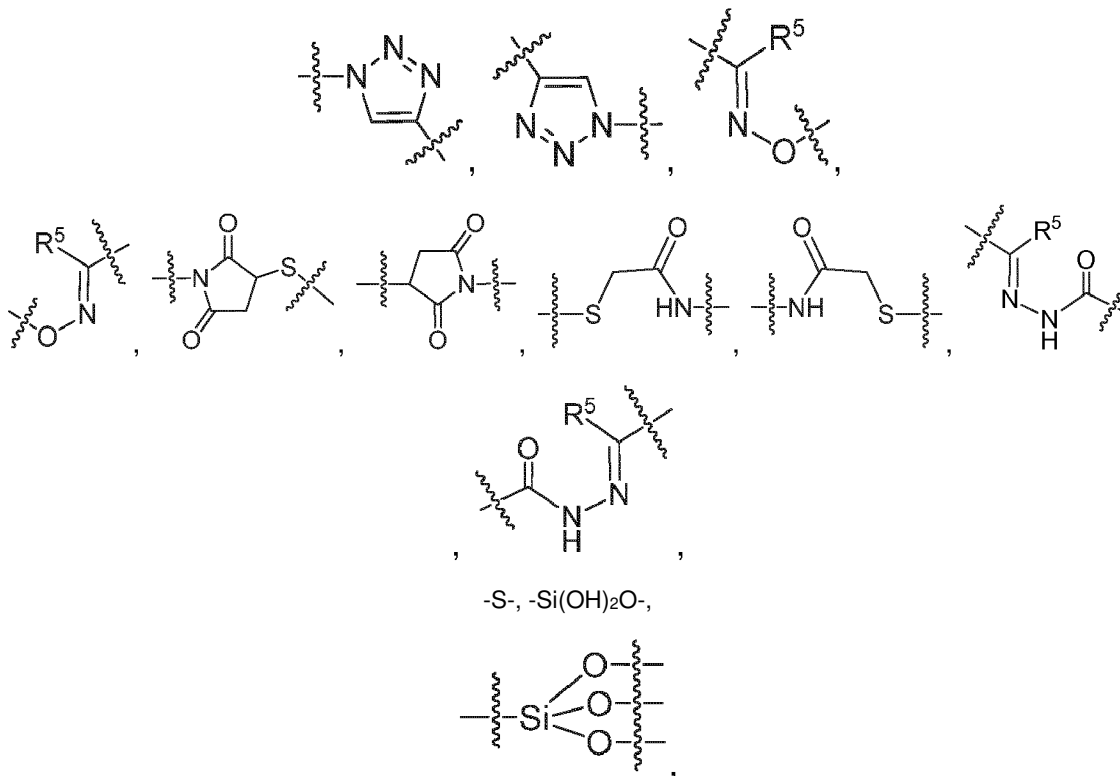
A₃ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n- o



5

$$\begin{aligned} & \text{A}_4\text{-C(=O)NH-}, \text{-C(=O)NH(CH}_2\text{)}_n\text{-}, \text{-O(CH}_2\text{)}_n\text{m-}, \text{-(CH}_2\text{)}_n\text{O m-}, \text{-(CH}_2\text{)}_n\text{O m(CH}_2\text{)}_n\text{-}, \text{-(CH}_2\text{)}_n\text{C(=O)NH-}, \text{-NHC(=O)(CH}_2\text{)}_n\text{-}, \\ & \text{-(CH}_2\text{)}_n\text{NHC(=O)-}, \text{-C(=O)NH(CH}_2\text{)}_n\text{S-}, \text{-S(CH}_2\text{)}_n\text{C(=O)NH-}, \text{-C(=O)NH(CH}_2\text{)}_n\text{NHC(=O)(CH}_2\text{)}_n\text{-}, \text{-C(=O)(CH}_2\text{)}_n\text{-}, \\ & \text{(CH}_2\text{)}_n\text{C(=O)-}, \text{-(CH}_2\text{)}_n\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{mNHC(=O)(CH}_2\text{)}_n\text{-}, \text{-(CH}_2\text{)}_n\text{NHC(=O)(CH}_2\text{)}_n\text{-}, \text{-(CH}_2\text{)}_n\text{NH((CH}_2\text{)}_n\text{O m(CH}_2\text{)}_n\text{-} \\ & \text{O(CH}_2\text{)}_n\text{mNHC(=O)(CH}_2\text{)}_n\text{-}; \end{aligned}$$

10 cada X^2 se selecciona independientemente de un enlace,



15

$$-\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{NH}-, -\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})-, -\text{C}(=\text{O})\text{NH}- \text{ y } -\text{NHC}(=\text{O})-;$$

cada R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, -C(=O)OH y -OH,

cada R⁵ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, fenilo o alquilo C₁₋₄ sustituido con 1 a 3 grupos OH;

cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y

20 cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

En ciertas realizaciones, la Unidad enlazadora (LU) es $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, en donde

L_1 es un enlace, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ o $-X^2-$;

L_2 es un enlace, $-A_2-$, o $-A_2X^2-$;

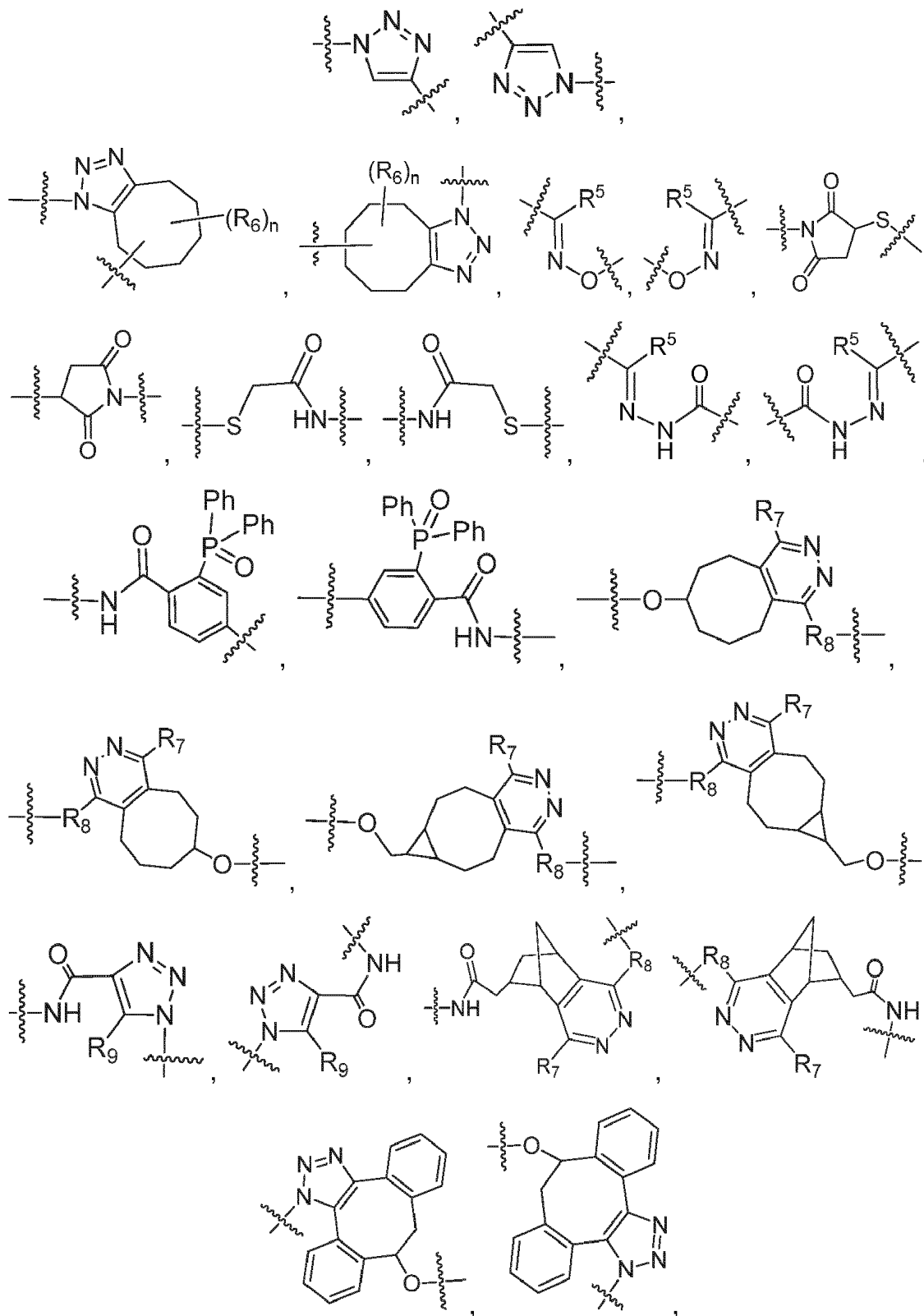
L_3 es un enlace, $-A_3-$, o $-A_3X^{2-}$;

25 L₄ es un enlace, -A₄-, -A₄X²⁻,

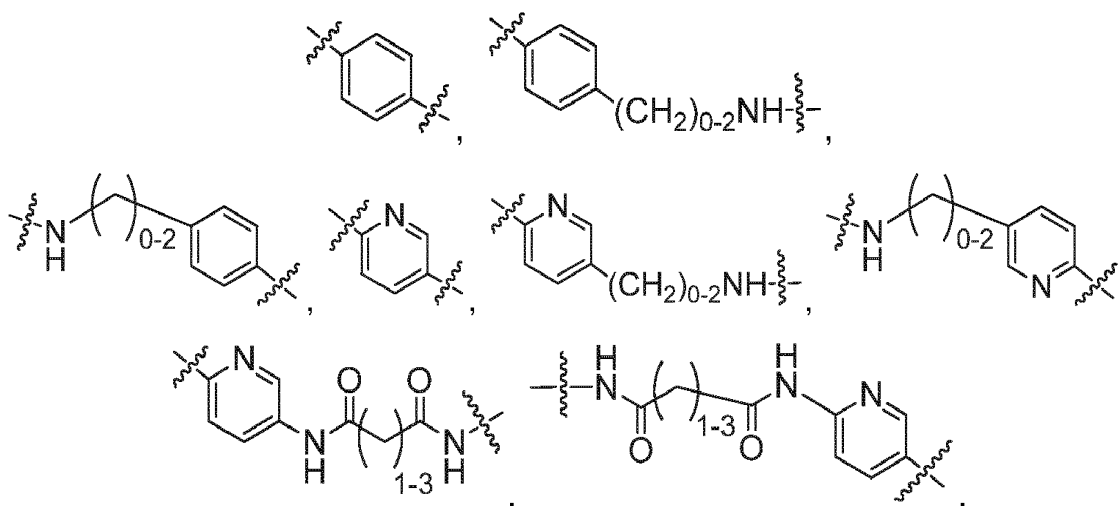

$$\text{A}_2 \text{ es } -\text{C}(=\text{O})\text{NH}-, -\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n-, -\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{S}-, -(\text{O}(\text{CH}_2)_n)_m-, -((\text{CH}_2)_n\text{O})_m(\text{CH}_2)_n-, -\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-, -(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})-, -\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-, -(\text{CH}_2)_n\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{O})_m(\text{CH}_2)_n-, -(\text{O}(\text{CH}_2)_n)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$$
CC(C)C(=O)NCCC(=O)NCCCNC(=O)N

A4 es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -(O(CH₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n- o -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n;

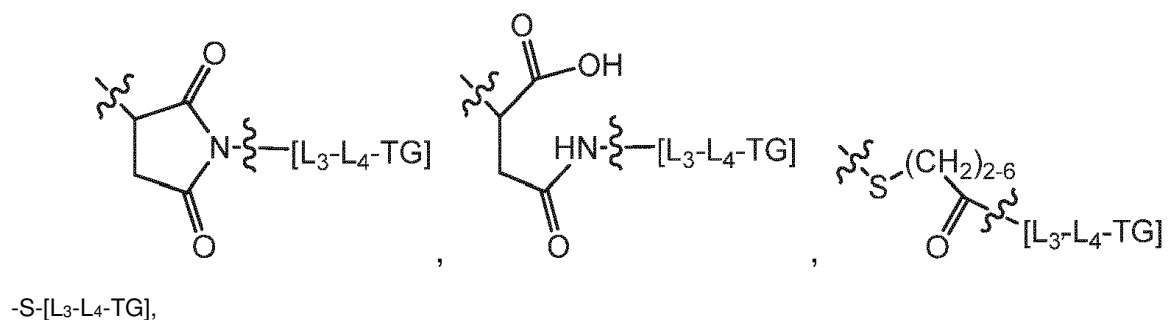
cada X^2 se selecciona independientemente de un enlace,

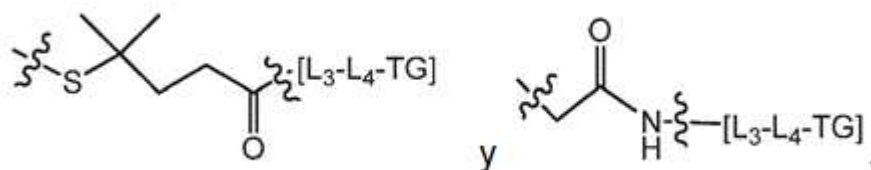

$$-\text{S}-, -\text{Si}(\text{OH})_2\text{O}-,$$

R^8 se selecciona independientemente de



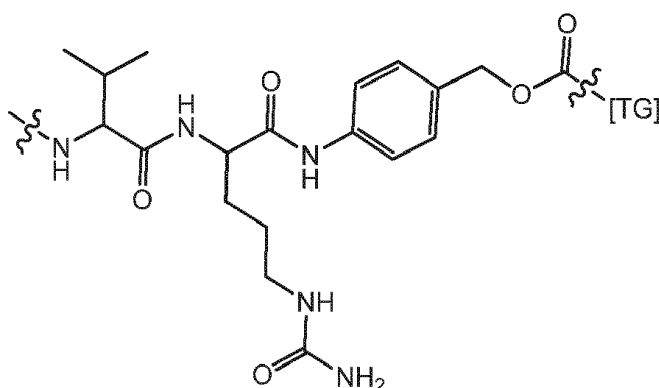
20 En ciertas realizaciones de cualquiera de los compuestos o métodos descritos en el presente documento, L₂ se selecciona de:





En ciertas realizaciones de cualquiera de los compuestos o métodos descritos en el presente documento, L_3 se selecciona entre $-(CH_2)_{2-6}-C(=O)-[L_4-TG]$; $-(CH_2)_{2-6}-NH-[L_4-TG]$; $-(CH_2)_{2-6}-S-[L_4-TG]$; $-(CH_2)_{2-6}-Z-[L_4-TG]$; y $-(CH_2)_{2-6}-Z-C(=O)-[L_4-TG]$, donde Z es O, NH o S.

- 5 En ciertas realizaciones de cualquiera de los compuestos o métodos descritos en el presente documento, L_4 es un enlace o un enlazador val-cit de esta fórmula:



Cuando L_4 es un enlazador val-cit, L_3 es preferiblemente $-(CH_2)_{2-6}-C(=O)-$.

- 10 En ciertas realizaciones de cualquiera de los compuestos o métodos descritos en el presente documento, TG es un maitansinoide tal como DM1 o DM4, o un compuesto de dolostatina 10, por ejemplo auristatinas MMAF o MMAE, o una caliqueamicina tal como N-acetil- γ -caliqueamicina, o una etiqueta o colorante tal como rodamina o tetrametilrodamina.

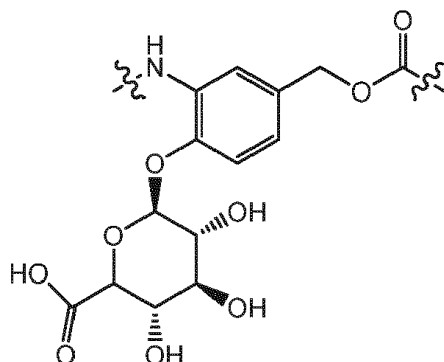
- 15 Como se usa en el presente documento, un "enlazador" es cualquier unidad estructural química que es capaz de unir un anticuerpo o un fragmento del mismo a un grupo terminal. Los enlazadores pueden ser susceptibles de escisión, tales como, escisión inducida por ácido, escisión inducida por luz, escisión inducida por peptidasa, escisión inducida por esterasa y escisión de enlace disulfuro, en condiciones en las que el compuesto o el anticuerpo permanecen activos. Alternativamente, los enlazadores pueden ser sustancialmente resistentes a la escisión. Un enlazador puede o no incluir un espaciador autoinmolante.

- 20 Ejemplos no limitantes de los enlazadores escindibles no enzimáticamente como se usan en el presente documento para conjugar un grupo terminal (TG) con los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos proporcionados en el presente documento incluyen, enlazadores lábiles al ácido, enlazadores que contienen una unidad estructural disulfuro, enlazadores que contienen una unidad estructural triazol, enlazadores que contienen una unidad estructural hidrazina, enlazadores que contienen una unidad estructural tioéter, enlazadores que contienen una unidad estructural diazo, enlazadores que contienen una unidad estructural oxima, enlazadores que contienen una unidad estructural amida y enlazadores que contienen una unidad estructural acetamida.

Ejemplos no limitantes de los enlazadores escindibles enzimáticamente como se usan en este documento para conjugar un grupo terminal (TG) con los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, enlazadores que se escinden por una proteasa, enlazadores que se escinden por una amidasa, y los enlaces se escinden por la β -glucuronidasa.

- 30 En ciertas realizaciones, dichos enlazadores escindibles por enzimas son enlazadores que se escinden mediante cathepsina, incluyendo cathepsina Z, cathepsina B, cathepsina H y cathepsina C. En ciertas realizaciones, el enlazador escindible enzimáticamente es un dipéptido escindido por cathepsina, incluyendo dipéptidos escindidos por cathepsina Z, cathepsina B, cathepsina H o cathepsina C. En ciertas realizaciones, el enlazador escindible enzimáticamente es un enlazador peptídico escindible por cathepsina B. En ciertas realizaciones, el enlazador escindible enzimáticamente es un enlazador dipéptido escindible con cathepsina B. En ciertas realizaciones, el enlazador escindible enzimáticamente que es un enlazador dipéptido escindible con cathepsina B es valina-citulina o fenilalanina-lisina. Otros ejemplos no limitantes de los enlazadores escindibles enzimáticamente como se usan en este documento conjugan un grupo

terminal (TG) con los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos que se incluyen en este documento, pero no se limitan a, enlazadores que se escinden por la β -glucuronidasa, por ejemplo,



Véase Ducry et al, Bioconjugate Chem, vol. 21(1), 5-13 (2010).

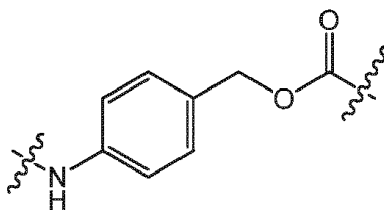
- 5 Los "espaciadores autoinmolantes" son unidades estructurales químicas bifuncionales unidas covalentemente en un extremo a una primera unidad estructural química y en los otros extremos a una segunda unidad estructural química, formando así una molécula tripartita estable. Tras la escisión de un enlace entre el espaciador autoinmolante y la primera unidad estructural química, los espaciadores autoinmolantes experimentan reacciones intramoleculares rápidas y espontáneas y, por lo tanto, se separan de la segunda unidad estructural química. Estas reacciones
- 10 intramoleculares generalmente involucran reordenamientos electrónicos como 1,4, o 1,6, o 1,8 reacciones de eliminación o ciclizaciones para formar anillos de cinco o seis miembros muy favorecidos. En ciertas realizaciones de la presente invención, la primera unidad estructural es un enlazador escindible por enzimas y esta escisión resulta de una reacción enzimática, mientras que en otras realizaciones la primera unidad estructural es un enlazador ácido lábil y esta escisión ocurre debido a un cambio en el pH. Según se aplica a la presente invención, la segunda unidad estructural es el grupo "Etiqueta" como se define en el presente documento. En ciertas realizaciones, la escisión de la primera unidad estructural del espaciador autoinmolante resulta de la escisión por una enzima proteolítica, mientras que en otras realizaciones resulta de escindida por una hidrolasa. En ciertas realizaciones, la escisión de la primera unidad estructural del espaciador autoinmolante resulta de la escisión por una enzima de catepsina.

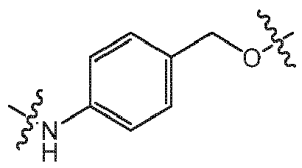
- 20 En ciertas realizaciones, el enlazador escindible por enzimas es un enlazador peptídico y el espaciador autoinmolante está unido covalentemente en uno de sus extremos al enlazador peptídico y está enlazado covalentemente en su otro extremo a una unidad estructural de fármaco. Esta molécula tripartita es estable y farmacológicamente inactiva en ausencia de una enzima, pero es enzimáticamente escindible por la enzima en el enlace que une covalentemente la unidad estructural espaciadora y la unidad estructural peptídica. La unidad estructural peptídica se escinde de la molécula tripartita que inicia el carácter autoinmolador de la unidad estructural espaciador, dando como resultado la
- 25 escisión espontánea del enlace que une covalentemente la unidad estructural espaciadora a la unidad estructural farmacológica, para efectuar así la liberación del fármaco en forma farmacológicamente activa.

- Ejemplos no limitantes del espaciador autoinmolante usado opcionalmente en la conjugación de un grupo terminal (TG) con los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos proporcionados en el presente documento incluyen, entre otros, unidades estructurales que incluyen una unidad estructural bencil carbonilo, una unidad estructural de éter bencílico, una unidad estructural de 4-aminobutirato, una unidad estructural hemitioamina o una unidad estructural N-acilhemitioamina.

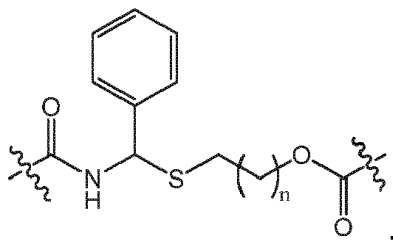
- Otros ejemplos de espaciadores autoinmolables incluyen, pero no se limitan a, grupos p-aminobenciloxycarbonilo, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo p-aminobenciloxycarbonilo, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol y orto o para-aminobencilacetales. En ciertas realizaciones, los espaciadores autoinmolantes usados en el presente documento que se someten a ciclización tras la hidrólisis del enlace amida, incluyen amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico.

En ciertas realizaciones, el espaciador autoinmolante es

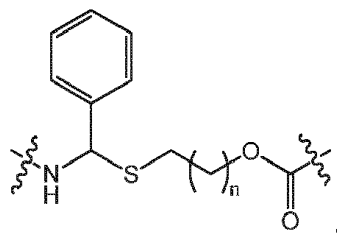




mientras que en otras realizaciones el espaciador autoinmolante es

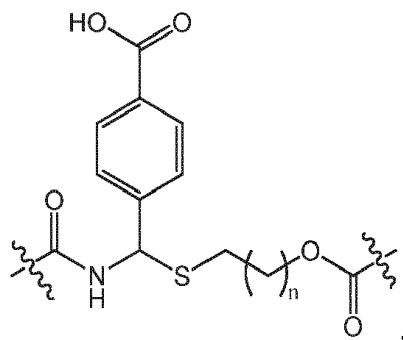


donde n es 1 o 2. En otras realizaciones, el espaciador autoinmolante es

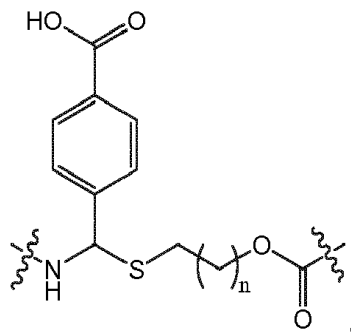


5

donde n es 1 o 2. En otras realizaciones, el espaciador autoinmolante es

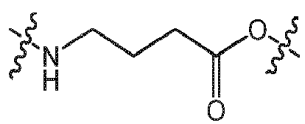


donde n es 1 o 2. En otras realizaciones, el espaciador autoinmolante es



10

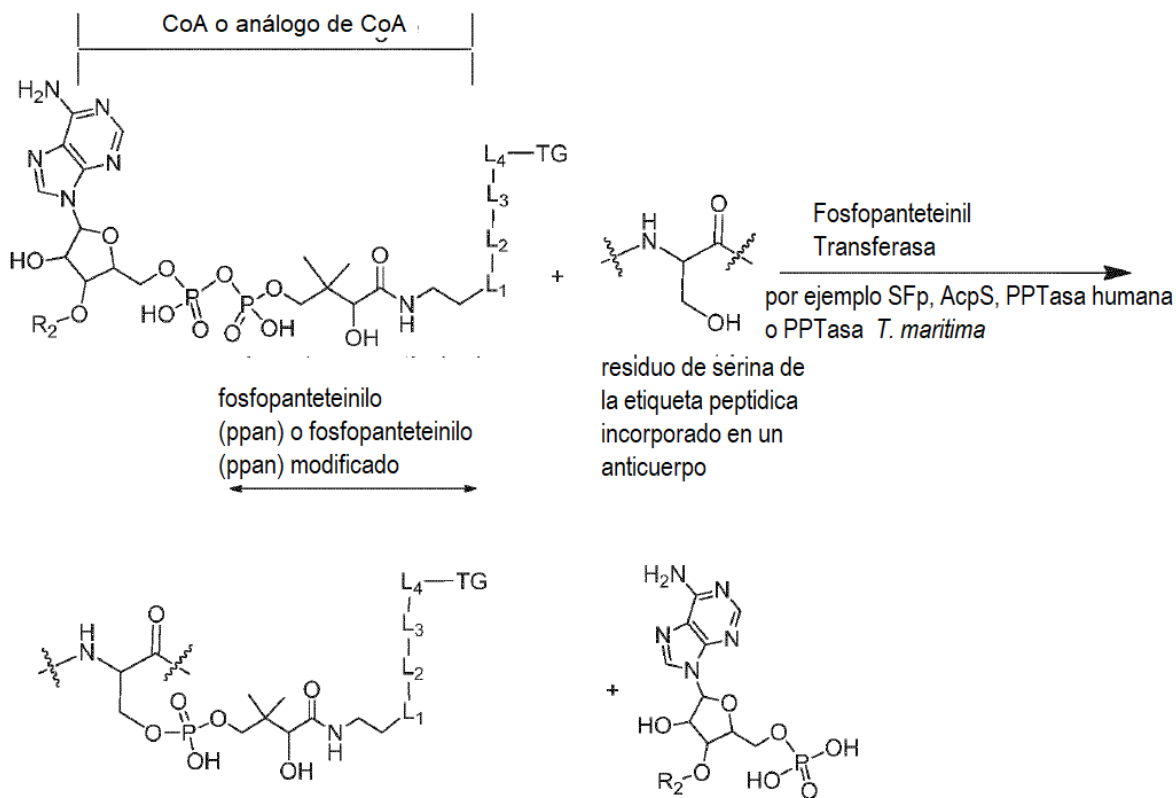
donde n es 1 o 2. En otras realizaciones, el espaciador autoinmolante es



donde n es 1 o 2.

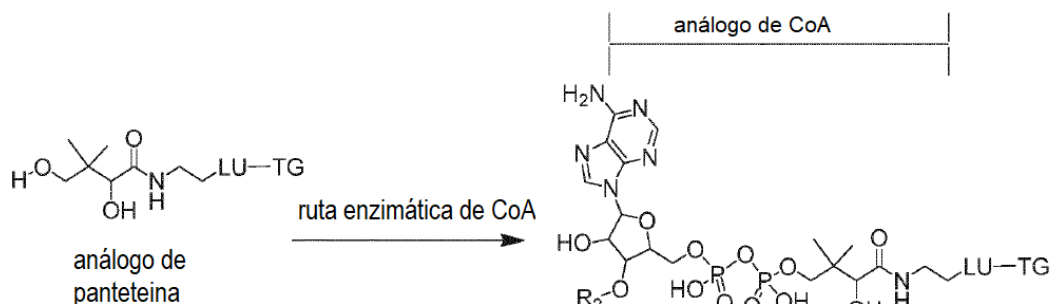
El esquema (Ib) ilustra la modificación postraducción de los anticuerpos modificados o fragmento de los mismos proporcionado en el presente documento en donde la Unidad de Enlace (LU) es -L₁-L₂-L₃-L₄-.

Esquema (Ib)

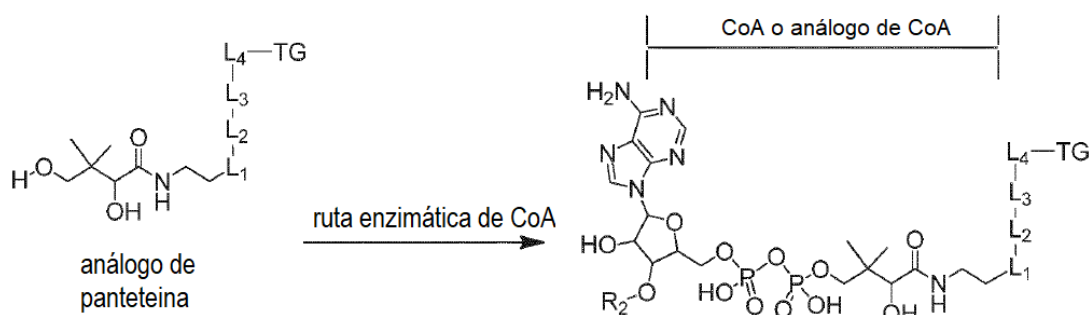


5 donde R₂, L₁, L₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

Los análogos de CoA del Esquema (Ia) y el Esquema (Ib) pueden obtenerse mediante síntesis química total, sin embargo, los análogos de CoA del Esquema (Ia) y el Esquema (Ib) se obtienen preferiblemente mediante un proceso quimioenzimático en donde los análogos de panteteína son químicamente sintetizados y luego convertidos biosintéticamente en el análogo de CoA correspondiente (véase Kristine M. Clarke et al., "In Vivo Reporter Labeling of Proteins via Metabolic Delivery of Coenzyme A Analogues", J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, p 11234-11235 y Jordan L. Meier et al., "Synthesis and Evaluation of Bioorthogonal Pantetheine Analogues for in Vivo Protein Modification", J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, pág. 12174-12184). A continuación se muestra la conversión biosintética para los análogos de CoA del Esquema (Ia):



mientras que a continuación se muestra la conversión biosintética para los análogos de CoA del Esquema (Ib):



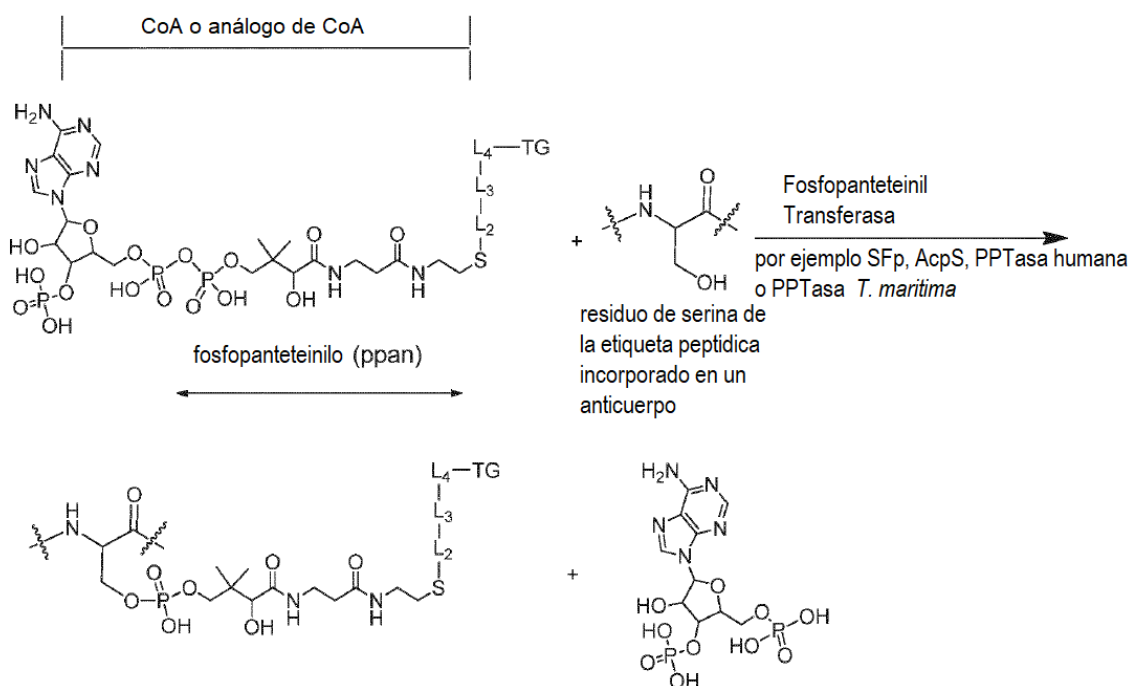
donde LU, L₁, L₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

- 5 En ciertos aspectos de la divulgación, la conversión biosintética se produce "*in vivo*", en la que el análogo de panteteína entra en una célula desde el medio circundante, por lo que una vez dentro de la célula se convierte por la vía enzimática de CoA en el correspondiente análogo de CoA. En una realización específica, se utiliza *E. coli* para la conversión biosintética de los análogos de panteteína en los correspondientes análogos de CoA, en donde el análogo de panteteína ingresa a *E. coli* desde los medios circundantes y, una vez dentro de la célula, el análogo de panteteína es
- 10 inicialmente fosforilado por la quinasa de pantenoteno (PanK o CoaA) usando adenosina-5'-trifosfato (ATP), luego adeniladas por la fosfopanteetano adenililtransferasa (PPAT o CoaD) para dar el análogo de desfosfo-CoA y luego se fosforilan más por la quinasa de fosfosenzima A (DPCK o CoaE) para producir el análogo de CoA.

- En otros aspectos de la divulgación, la conversión biosintética se produce "*in vitro*", en la que la ruta de CoA enzimática es reconstituida con el análogo de panteteína, por lo que se convierte "*in-vitro*" por la ruta enzimática de CoA reconstituida en el análogo de CoA correspondiente. En una realización específica de la conversión "*in vitro*", la vía enzimática de CoA reconstituida es la vía enzimática de CoA de *E. coli*, en la que el análogo de panteteína es fosforilado inicialmente por CoaA y ATP, luego se adenila por CoaD para dar el análogo defosfo-CoA y luego es fosforilado adicionalmente por CoaE para dar el análogo de CoA.
- 15

- En ciertas realizaciones, la Unidad enlazadora (LU) es -C(=O)NH(CH₂)₂S-L₂-L₃-L₄- y R₂ es -P(=O)(OH)₂, y en dicha realización el grupo terminal está vinculado a CoA. El esquema (Ic) ilustra la modificación postraducción de los anticuerpos modificados o fragmento de los mismos que se proporciona en el presente documento para la realización específica en la que la PPTasa cataliza la reacción entre la unidad estructural de serina conservada en la etiqueta del péptido corto incorporado y un grupo terminal (TG) unido a la coenzima A (CoA):
- 20

Esquema (lc)



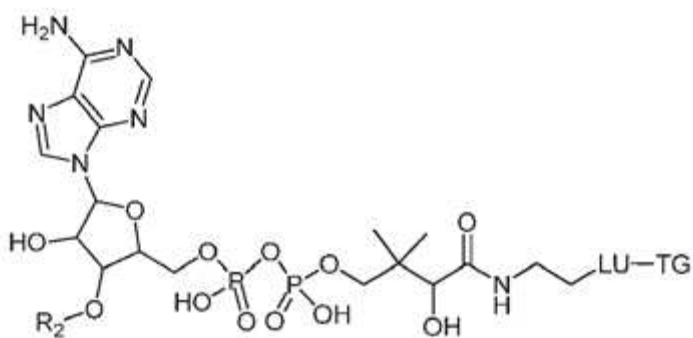
donde L_2 , L_3 , L_4 y TG son como se definen aquí.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos proporcionados en el presente documento se marcan específicamente para el sitio mediante un método de una etapa como se muestra en el Esquema (Ia), el Esquema (Ib) y el Esquema (Ic), en donde un grupo terminal vinculado a CoA o un análogo de CoA reacciona con la serina conservada de la etiqueta peptídica corta diseñada en el anticuerpo.

El método de un solo paso incluye las etapas de:

(a) proporcionar un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo que ha sido diseñado para contener una etiqueta peptídica pequeña, y en donde la etiqueta peptídica es un sustrato de una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa, y

2. (b) marcar el anticuerpo modificado o fragmento del mismo con un grupo terminal incubando el anticuerpo modificado o fragmento del mismo con una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa en presencia de un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (A):

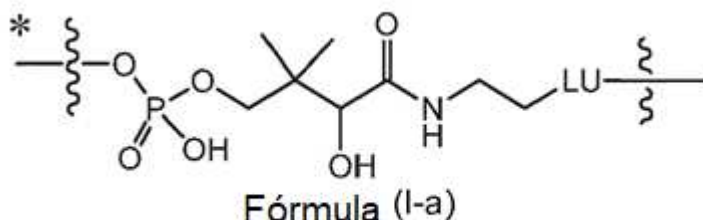


Fórmula (A)

en donde:

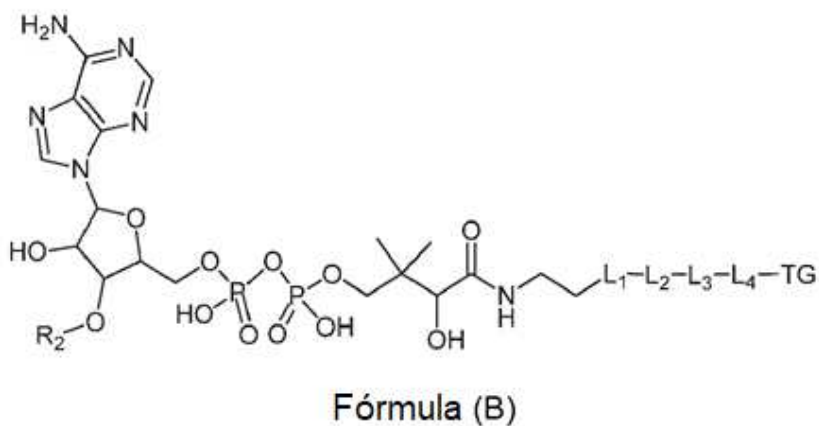
R₂, Unidad enlazadora (LU) y TG son como se describen en este documento.

- 5 En tales métodos de un solo paso que usan un compuesto de fórmula (A), el grupo terminal (TG) se conjuga de este modo al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la fórmula (I-a). El enlazador de Fórmula (I-a) está unido a la etiqueta del péptido pequeño mediante un enlace fosfodiéster formado entre la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo y el grupo hidroxilo del residuo de serina conservado de la etiqueta del péptido corto diseñado en el anticuerpo:



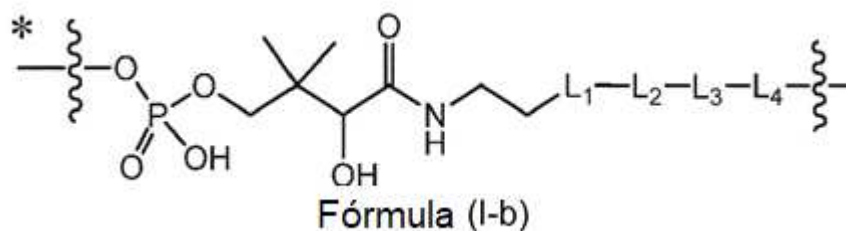
donde LU es como se define en el presente documento y el * indica que la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo está unida a la etiqueta del péptido pequeño.

- 10 En ciertas realizaciones, El método de un paso incluye las etapas de:
- (a) proporcionar un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo que ha sido diseñado para contener una etiqueta peptídica pequeña, y en donde la etiqueta peptídica es un sustrato de una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa, y
- 15 (b) marcar el anticuerpo modificado o fragmento del mismo con un grupo terminal incubando el anticuerpo modificado o fragmento del mismo con una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa en presencia de un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (B):



donde R₂, L₁, L₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

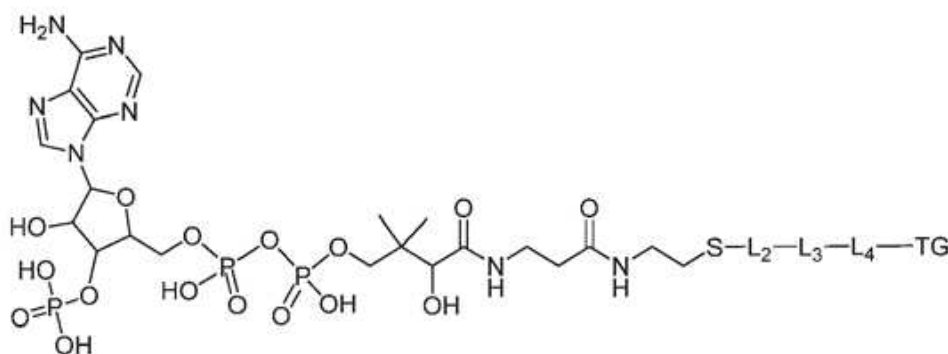
- 20 En tales métodos de un solo paso que utilizan un compuesto de Fórmula (B) descrito anteriormente, el grupo terminal se une de este modo al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la Fórmula (I-b). El enlazador de Fórmula (I-b) está unido a la etiqueta del péptido pequeño mediante un enlace fosfodiéster formado entre la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo y el grupo hidroxilo del residuo de serina conservado de la etiqueta del péptido corto diseñado en el anticuerpo:



donde L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son como se definen en este documento y el * indica que la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo está unida a la etiqueta del péptido pequeño.

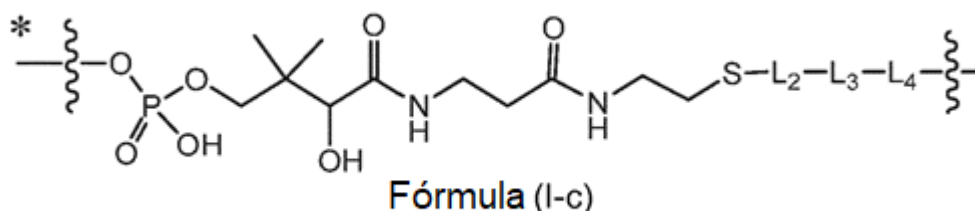
En otras realizaciones, El método de una etapa incluye las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo que ha sido diseñado para contener una etiqueta peptídica pequeña, y en donde la etiqueta peptídica es un sustrato de una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa, y
- (b) marcar el anticuerpo modificado o fragmento del mismo con un grupo terminal incubando el anticuerpo modificado o fragmento del mismo con una enzima que tenga actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa en presencia de un
- 10 compuesto que tenga la estructura de Fórmula (C):



donde L_2 , L_3 , L_4 y TG son como se definen aquí.

- 15 En tales métodos de un solo paso que utilizan un compuesto de fórmula (C) descrito anteriormente, el grupo terminal se une al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la fórmula (I-c). El enlazador de Fórmula (I-c) está unido a la etiqueta del péptido pequeño mediante un enlace fosfodiéster formado entre la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo y el grupo hidroxilo del residuo de serina conservado de la etiqueta del péptido corto diseñado en el anticuerpo:

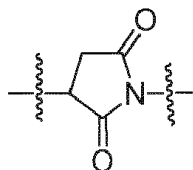


- 20 donde L_2 , L_3 y L_4 son como se definen en este documento y el * indica que la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo está unida a la etiqueta del péptido pequeño.

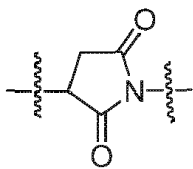
En ciertas realizaciones de los métodos de un solo paso descritos en el presente documento, el anticuerpo modificado o fragmento del mismo se pone en contacto con un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (A), Fórmula (B) o

5 Fórmula (C) y una enzima 4'-fosfopanteteinilo transferasa que se coexpresa en la misma célula que el anticuerpo modificado expresado o fragmento del mismo. En ciertas realizaciones de los métodos de un paso descritos en el presente documento, el anticuerpo modificado o fragmento del mismo se pone en contacto en el medio de cultivo celular con un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (A), Fórmula (B) o Fórmula (C) y la enzima 4'-fosfopanteteinil transferasa producida en la misma célula o en otra. En ciertas realizaciones de los métodos de una etapa descritos en el presente documento, la enzima 4'-fosfopanteteinil-transferasa se inmoviliza sobre un soporte sólido. En ciertas realizaciones, el soporte sólido está compuesto opcionalmente de un polímero sobre una perla o una columna.

10 En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e inmunoconjugados proporcionados en el presente documento: L_1 es $-A_1X^2-$, L_2 es un enlace, L_3 es un enlace, L_4 es $-A_4-$, A_1 es $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, A_4 es $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, y X^2 es

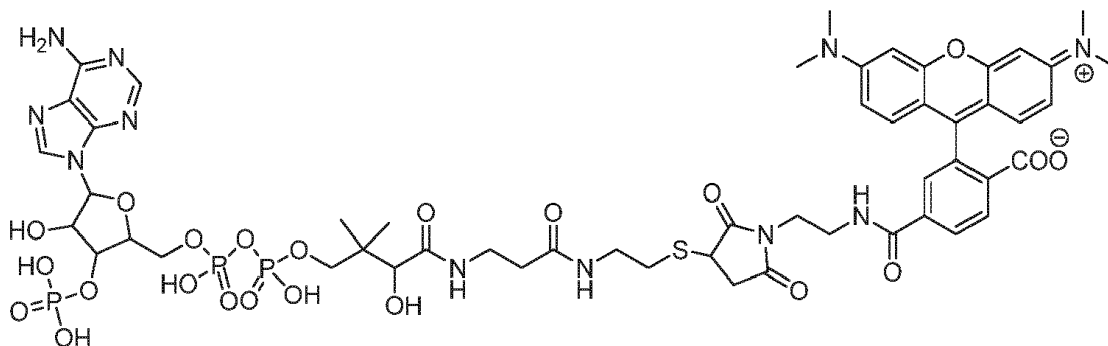


En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e inmunoconjugados proporcionados en el presente documento: L_1 es $-A_1X^2-$, L_2 es un enlace, L_3 es un enlace, L_4 es $-A_4-$, A_1 es $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, A_4 es $-(CH_2)_nNHC(=O)-$; X^2 es

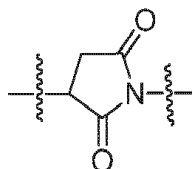


15 y TG es una sonda fluorescente.

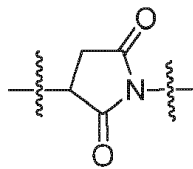
En ciertas realizaciones del compuesto de Fórmula (B) es



En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e inmunoconjugados proporcionados en el presente documento: L_1 es $-A_1X^2-$, L_2 es un enlace, L_3 es un enlace, L_4 es $-A_4-$, A_1 es $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, A_4 es $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, y X^2 es

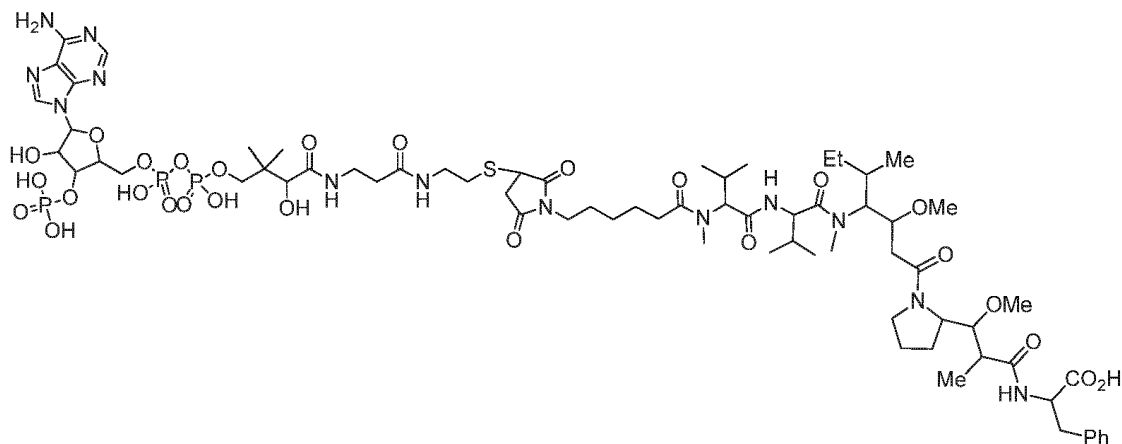


20 En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e inmunoconjugados proporcionados en el presente documento: L_1 es $-A_1X^2-$, L_2 es un enlace, L_3 es un enlace, L_4 es $-A_4-$, A_1 es $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, A_4 es $-(CH_2)_nNHC(=O)-$; X_2 es

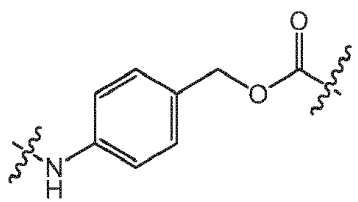


y TG es un grupo farmacológico

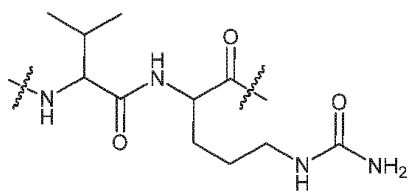
En ciertas realizaciones, el compuesto de Fórmula (B) es



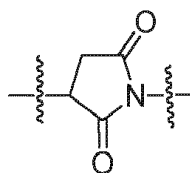
5 En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e immunoconjugados proporcionados en el presente documento: L₁ es -A₁X²⁻, L₂ es -A₂-, L₃ es -A₃-, L₄ es



A₁ es -C(=O)NH(CH₂)_nS-, A₂ es -(CH₂)_nC(=O), A₃ es

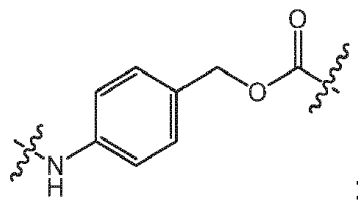


y X² es

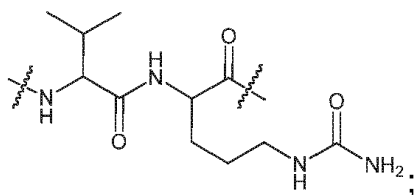


10

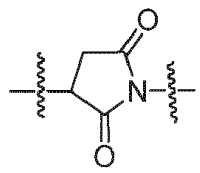
En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e immunoconjugados proporcionados en el presente documento: L₁ es -A₁X²⁻, L₂ es -A₂-, L₃ es -A₃-, L₄ es



A₁ es -C(=O)NH(CH₂)_nS-, A₂ es -(CH₂)_nC(=O), A₃ es

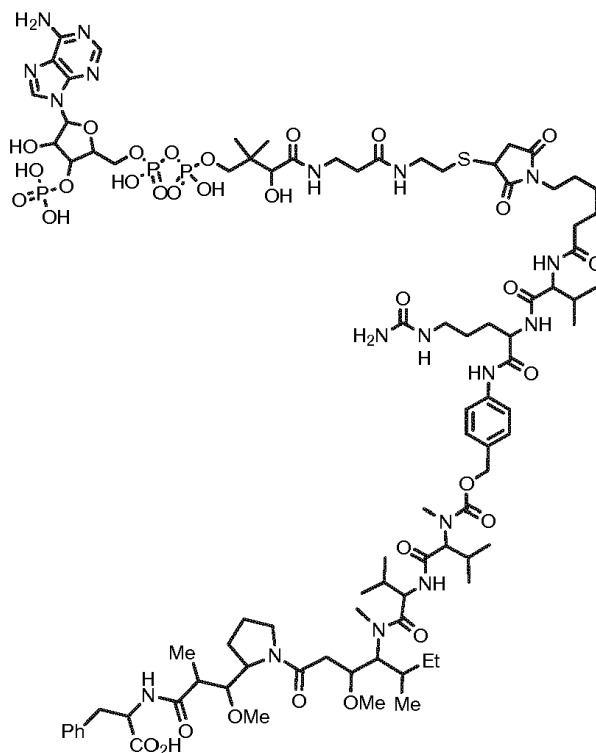


X^2 es



y TG es un grupo farmacológico.

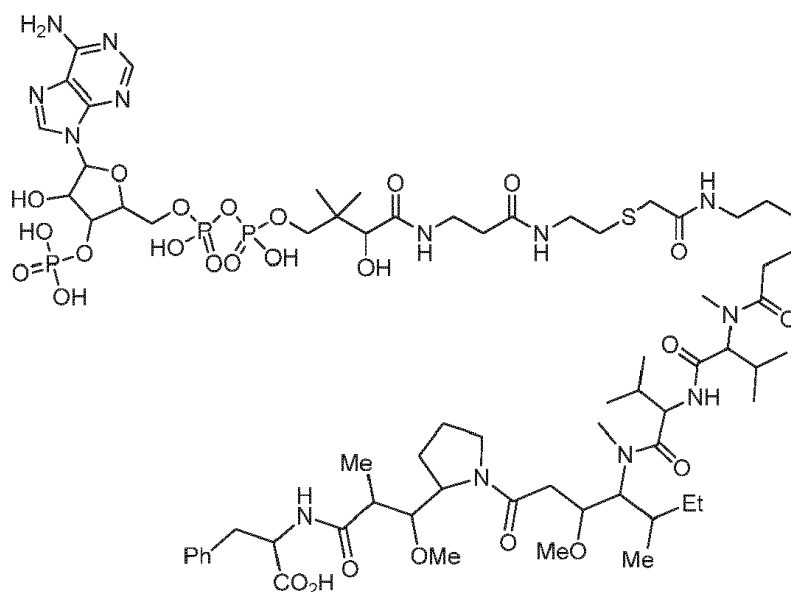
- 5 En ciertas realizaciones, el compuesto de Fórmula (B) es



En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e inmunoconjugados proporcionados en el presente documento: L_1 es un $-A_1X^2-$, L_2 es un enlace-, L_3 es $-A_3-$, L_4 es un enlace, A_1 es $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{S}-$, A_3 es $-(\text{CH}_2)_nC(=\text{O})-$, y X^2 es $-(\text{CH}_2)_nC(=\text{O})\text{NH}-$.

- 10 En ciertas realizaciones de los métodos, compuestos e inmunoconjugados proporcionados en el presente documento: L_1 es un $-A_1X^2-$, L_2 es un enlace-, L_3 es $-A_3-$, L_4 es un enlace, A_1 es $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{S}-$, A_3 es $-(\text{CH}_2)_nC(=\text{O})-$, X^2 es $-(\text{CH}_2)_nC(=\text{O})\text{NH}-$, y TG es un grupo farmacológico.

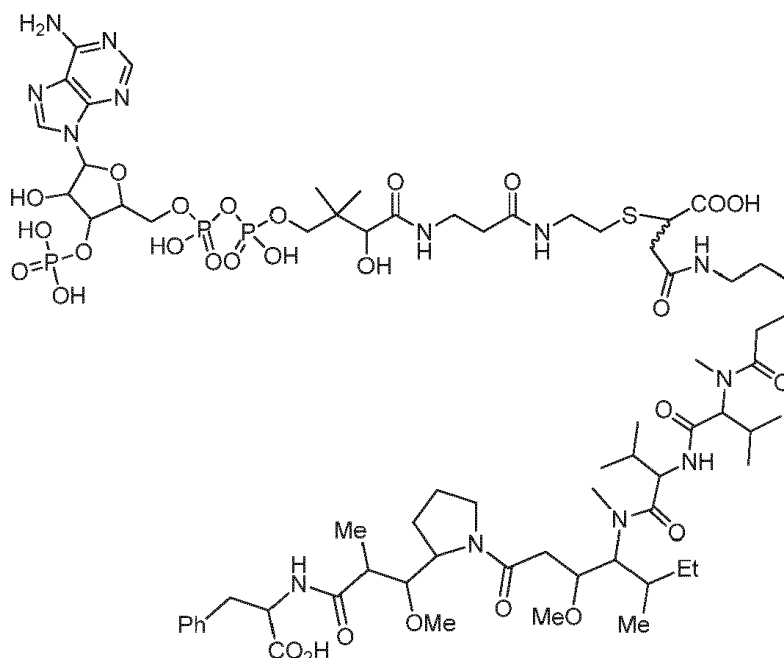
En ciertas realizaciones, el compuesto de Fórmula (B) es



En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e inmunoconjugados proporcionados en el presente documento: L₁ es un -A₁X²-, L₂ es un enlace, L₃ es -A₃-, L₄ es un enlace, A₁ es -C(=O)NH(CH₂)_nS, A₃ es -(CH₂)_nC(=O)-, X² es -CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, y R⁴ es -C(=O)OH.

- 5 En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e inmunoconjugados proporcionados en el presente documento: L₁ es un -A₁X²⁻, L₂ es un enlace, L₃ es -A₃-, L₄ es un enlace, A₁ es -C(=O)NH(CH₂)_nS, A₃ es -(CH₂)_nC(=O)-, X²⁻ es -CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, R⁴ es -C(=O)OH, y TG es un grupo farmacológico.

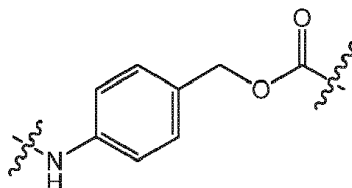
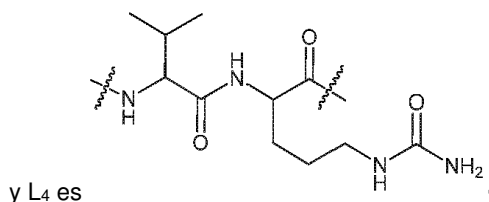
En ciertas realizaciones, el compuesto de Fórmula (B) es



- 10 En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e inmunoconjugados proporcionados en el presente documento: L₁ es -A₁X²-, donde A₁ es -C(=O)NH(CH₂)_nS- y X² es -(CH₂)C(=O)NH-; L₂ es un enlace; L₃ es un enlace, y L₄ es -A₄- en donde A₄ es -(CH₂)_nNHC(=O)-.

En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e inmunoconjugados proporcionados en el presente documento: L₁ es -A₁X²⁻, en donde A₁ es -C(=O)NH(CH₂)_nS- y X²⁻ es -(CH₂)C(=O)NH-; L₂ es un enlace; L₃ es un enlace; L₄ es -A₄-, en donde A₄ es -(CH₂)_nC(=O)-.

En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e inmunoconjugados proporcionados en el presente documento: L_1 es $-A_1X^2-$, en donde A_1 es $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$ y X^2 es $-(CH_2)C(=O)NH-$; L_2 es $-A_2-$, en donde A_2 es $-(CH_2)_nC(=O)-$; L_3 es $-A_3-$, en donde A_3 es

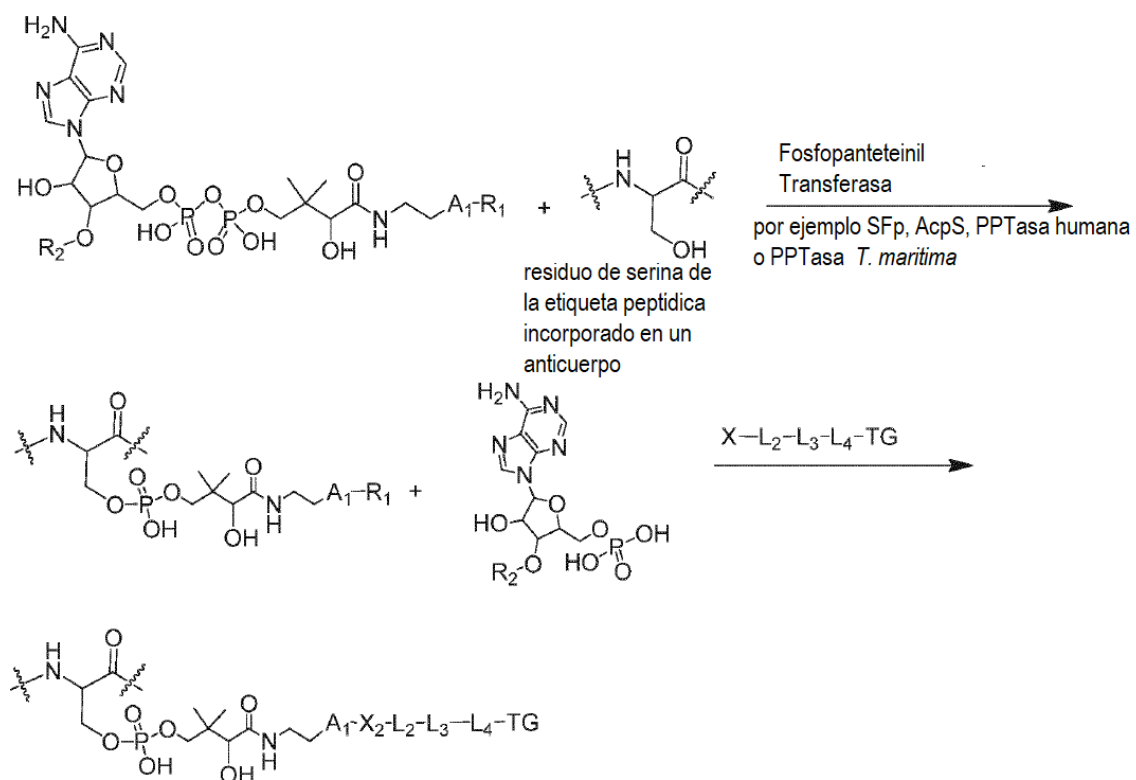


5

En ciertas realizaciones de métodos, compuestos e inmunoconjugados proporcionados en el presente documento: L_1 es un $-A_1X^2-$, en donde A_1 es $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$ y X^2 es $-(CH_2)C(=O)NH-$; L_2 es un enlace-; L_3 es $-A_3-$, en donde A_3 es $-(CH_2)_nC(=O)-$, y L_4 es un enlace.

Método de dos etapas

- 10 Alternativamente, los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos proporcionados aquí se marcan específicamente para el sitio mediante un método de dos etapas, en donde, en la primera etapa, el grupo protésico ppan de CoA, o el grupo protésico ppan modificado del análogo de CoA, que contiene un grupo funcional (R_1) está unido a la etiqueta peptídica corta por un enlace fosfodiéster formado entre la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo y el grupo hidroxilo del residuo de serina conservado de la etiqueta peptídica corta que se ha incorporado en el anticuerpo. En la segunda etapa, un grupo terminal (TG) unido o directamente unido a un grupo que es reactivo con el grupo funcional (R_1) se hace reaccionar con el grupo funcional (R_1) en el grupo protésico ppan de CoA, o en el grupo modificado, o en el grupo protésico ppan del análogo de CoA, que de este modo une directamente el grupo terminal al anticuerpo modificado o fragmento del mismo o une el grupo terminal al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de una Unidad enlazadora (LU).
- 15
- 20 Una realización del método de dos etapas se muestra en el Esquema (IIa).

Esquema (IIa)

en donde X y un R₁ correspondiente son como se indican a continuación en la Tabla 3, y donde R₂, A₁, L₂, X₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí:

Tabla 3

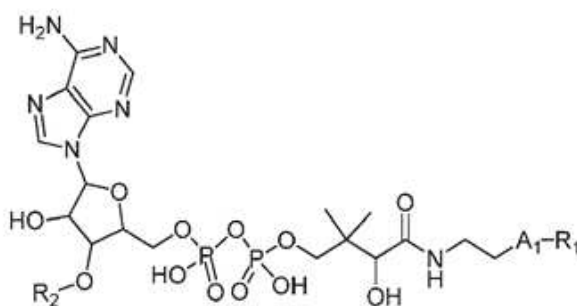
X	R ₁
un tiol	un tiol, una maleimida o una haloacetamida
una azida	un alquino, una triarilfosfina, un cicloocteno o un oxanobornadieno
una triarilfosfina	una azida
un oxanobornadieno	una azida
un alquino	una azida
un alqueno	una azida
un cicloocteno	una diariltetrazina
una diariltetrazina	un cicloocteno
una monoariltetrazina	un norborneno
un norborneno	una monoariltetrazina

X	R ₁
un aldehído	una hidroxilamina o una hidrazina o NH ₂ -NH-C(=O)-
una cetona	una hidroxilamina o una hidrazina o NH ₂ -NH-C(=O)-
una hidroxilamina	un aldehído o una cetona
una hidrazina	un aldehído o una cetona
NH ₂ -NH-C(=O)-	un aldehído o una cetona
una haloacetamida	un tiol
una maleimida	un tiol

El alqueno, alquino, triaril fosfina, cicloocteno, oxanobornadieno, diaril tetrazina, monoaril tetrazina y norborneno de X y R₁ están opcionalmente sustituidos.

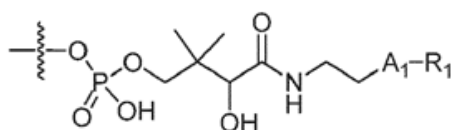
El método de dos etapas del Esquema (IIa) incluye las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo que se ha diseñado para contener una etiqueta peptídica, y en donde la etiqueta peptídica es un sustrato de una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa;
- (b) etiquetar el anticuerpo modificado o su fragmento mediante:
- 10 incubar el anticuerpo modificado o el fragmento del mismo con una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa en presencia de un compuesto de Fórmula (D),



Fórmula (D)

uniendo de este modo un grupo 4'-fosfopanteteinil activado de Fórmula (D-a) a la etiqueta del péptido;



Fórmula (D-a)

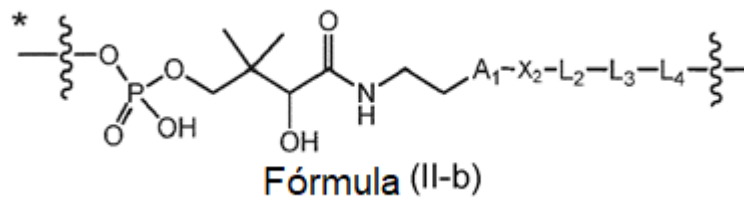
y

(c) hacer reaccionar el grupo 4'-fosfopanteteinilo activado con un compuesto de Fórmula (IIa):

X-L₂-L₃-L₄-TG Fórmula (II-a),

donde X, R₁, R₂, A₁, L₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

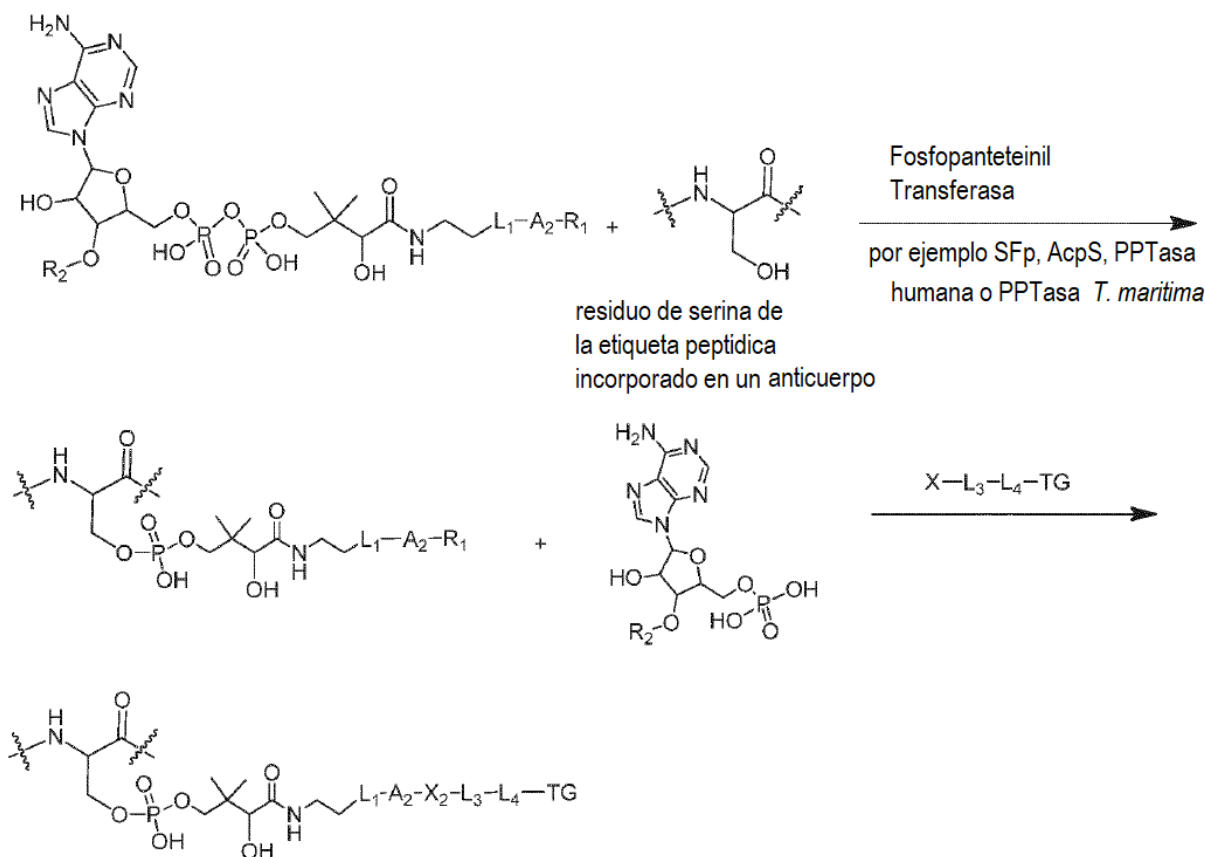
- 5 Como resultado del método de dos etapas del esquema (IIa), el grupo terminal se une al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la fórmula (IIb):



donde A₁, X₂, L₂, L₃ y L₄ son como se definen en este documento y el * indica que la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo modificada está unida a la etiqueta del péptido pequeño.

- 10 Otra realización del método de dos etapas se muestra en el Esquema (IIb).

Esquema (IIb)



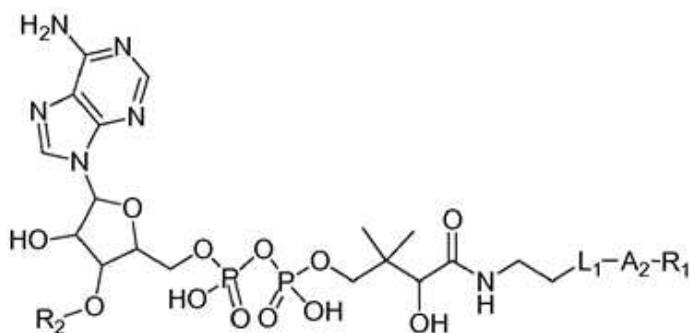
donde X, R₁, R₂, L₁, A₂, X₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

El método de dos etapas del Esquema (IIb) incluye las etapas de:

(a) proporcionar un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo que ha sido diseñado para contener una etiqueta peptídica corta, y en donde la etiqueta peptídica es un sustrato de una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa;

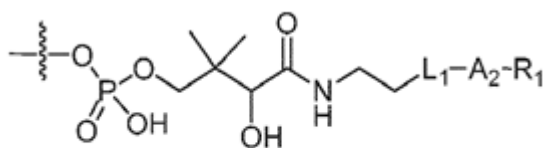
(b) etiquetar el anticuerpo modificado o su fragmento mediante:

- 5 incubar el anticuerpo modificado o un fragmento del mismo con una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa en presencia de un compuesto de Fórmula (E),



Fórmula (E)

uniendo de este modo un grupo 4'-fosfopantoetinilo activado de Fórmula (E-a) a la etiqueta corta del péptido;



Fórmula (E-a)

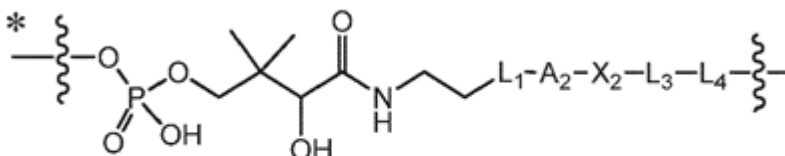
10 y

(c) hacer reaccionar el grupo 4'-fosfopanteteinilo activado con un compuesto de Fórmula (II-c):

X-L3-L4-TG Fórmula (II-c),

donde X, R1, R2, L1, A2, L3, L4 y TG son como se definen aquí.

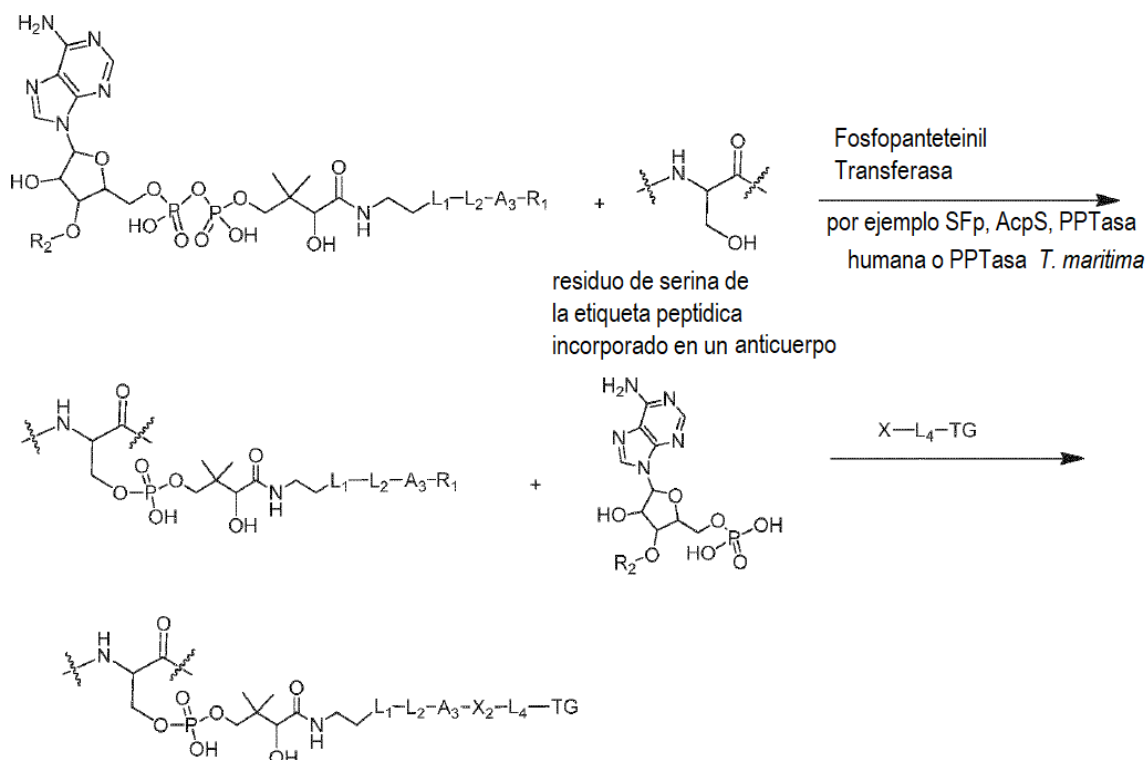
- 15 Como resultado del método de dos etapas del esquema (IIb), el grupo terminal se une al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la fórmula (II-d):



Fórmula (II-d)

donde L1, A2, X2, L3 y L4 son como se definen en este documento y el * indica que la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo modificada está unida a la etiqueta del péptido pequeño.

Otra realización del método de dos etapas se muestra en el Esquema (II-c).

Esquema (IIC)

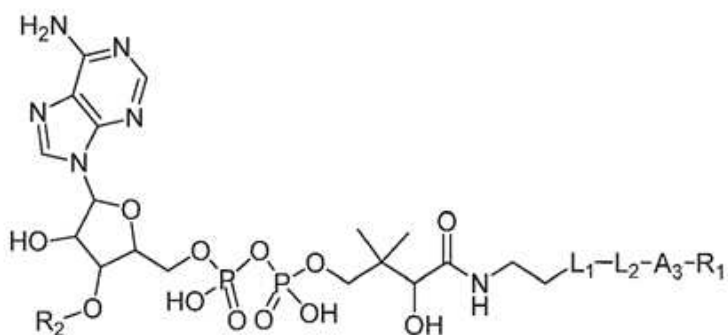
donde X, R₁, R₂, L₁, L₂, X₂, A₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

El método de dos etapas del Esquema (IIC) incluye las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo que ha sido diseñado para contener una etiqueta peptídica corta, y en donde la etiqueta peptídica es un sustrato de una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa;
- (b) etiquetar el anticuerpo modificado o su fragmento mediante:

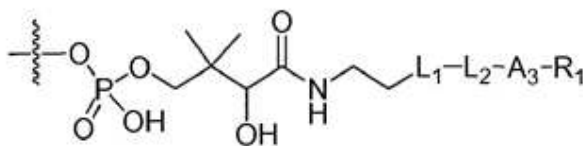
incubar el anticuerpo modificado o un fragmento del mismo con una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa en presencia de un compuesto de Fórmula (F),

10



Fórmula (F)

uniendo de este modo un grupo 4'-fosfopanteteinil activado de Fórmula (F-a) a la etiqueta peptídica corta;



Fórmula (F-a)

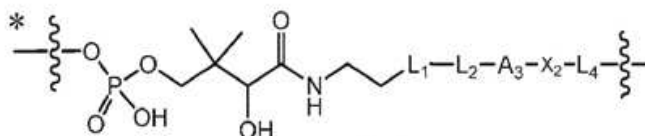
y

(c) hacer reaccionar el grupo 4'-fosfopanteteinilo activado con un compuesto de Fórmula (IIe):

5 X-L4-TG Fórmula (II-e),

donde X, R₁, R₂, L₁, L₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

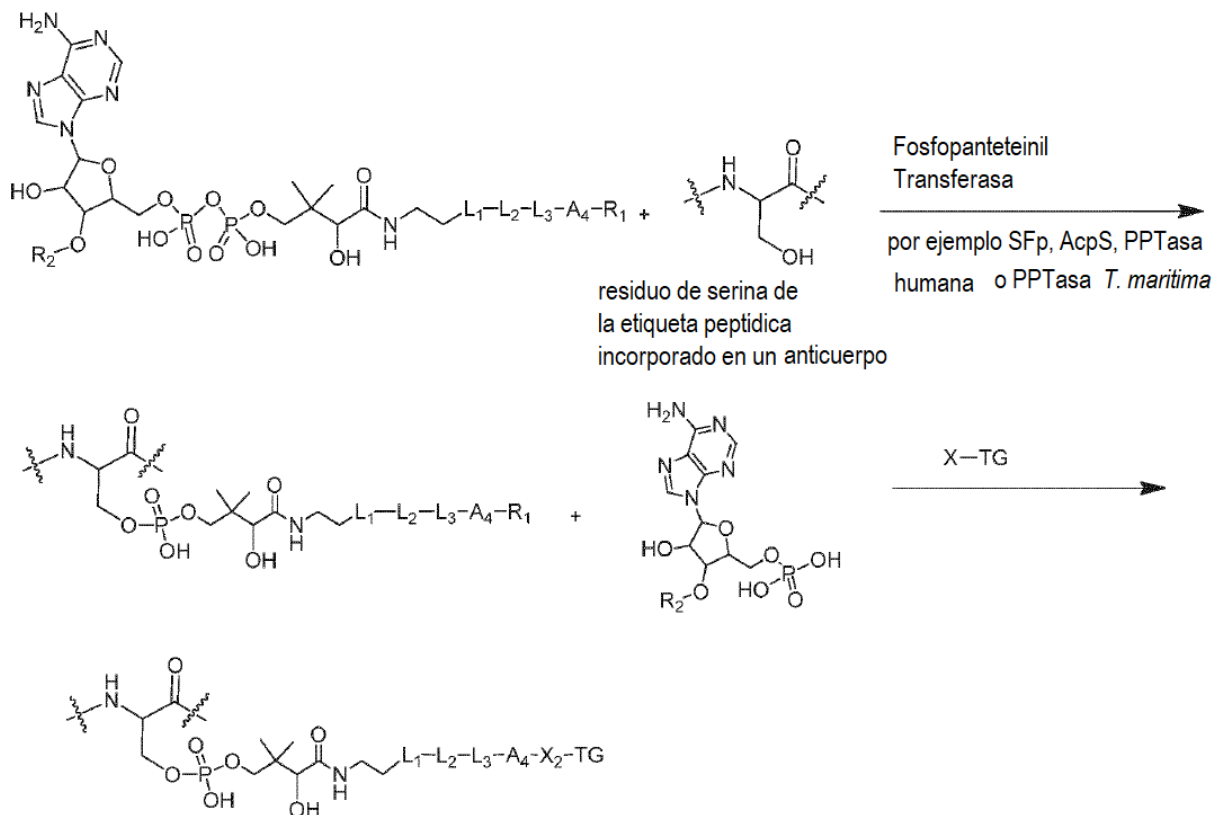
Como resultado del método de dos etapas del Esquema (IIc), el grupo terminal se une al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la Fórmula (II-f):



Fórmula (II-f)

10 donde L₁, L₂, A₃, X₂ y L₄ son como se definen en este documento y el * indica que la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo modificada está unida a la etiqueta del péptido pequeño.

Otra realización del método de dos etapas se muestra en el Esquema (IIId).

Esquema (IId)

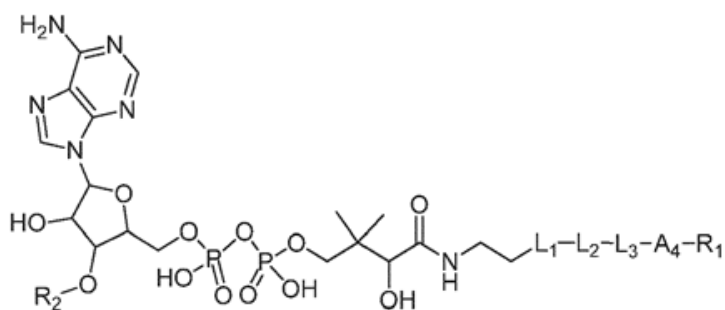
donde X, R₁, R₂, L₁, L₂, L₃, A₄, X₂ y TG son como se definen aquí.

El método de dos etapas del Esquema (IId) incluye las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo que ha sido diseñado para contener una etiqueta peptídica corta, y en donde la etiqueta peptídica es un sustrato de una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa;

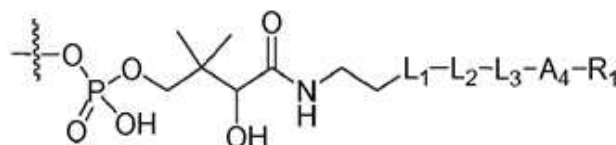
- (b) etiquetar el anticuerpo modificado o su fragmento mediante:

incubar el anticuerpo modificado o un fragmento del mismo con una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa en presencia de un compuesto de Fórmula (G),



Fórmula (G)

uniendo de este modo una 4'-fosfopanteteinil transferasa activada de Fórmula (G-a) a la etiqueta peptídica corta;



Fórmula (G-a)

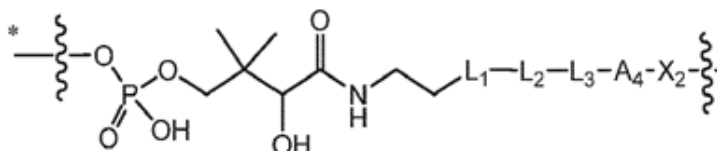
y

(c) hacer reaccionar el grupo 4'-fosfopanteteinilo activado con un compuesto de Fórmula (II-g):

X-TG Fórmula (II-g),

5 donde X, R₁, R₂, L₁, L₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

Como resultado del método de dos etapas del Esquema (IId), el grupo terminal se une al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la Fórmula (II-h):

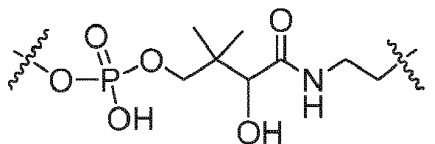


Fórmula (II-h)

10 donde L₁, L₂, L₃, A₄ y X₂ son como se definen en este documento y el * indica que la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo modificada está unida a la etiqueta del péptido pequeño.

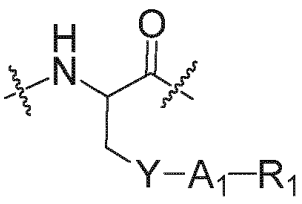
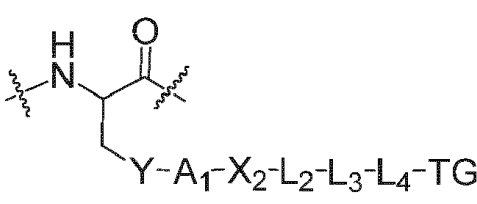
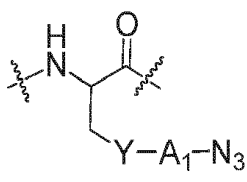
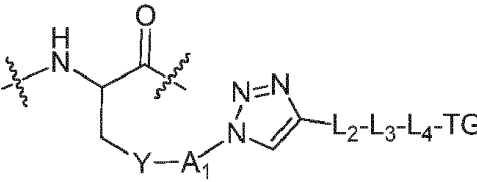
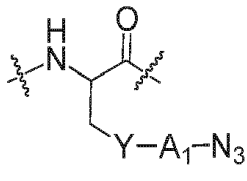
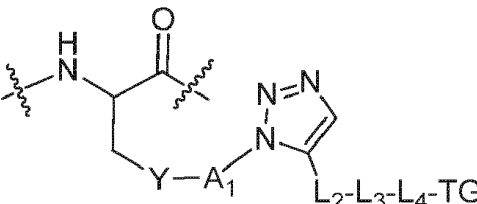
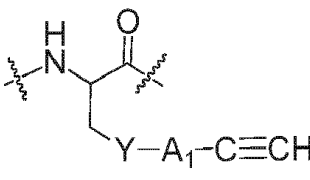
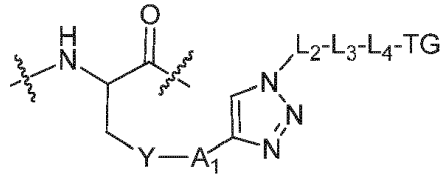
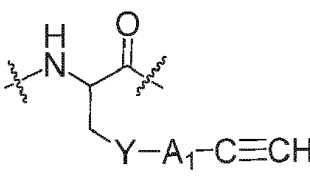
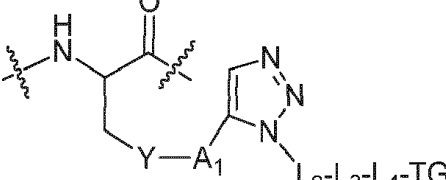
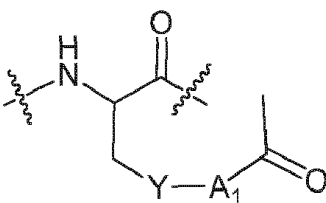
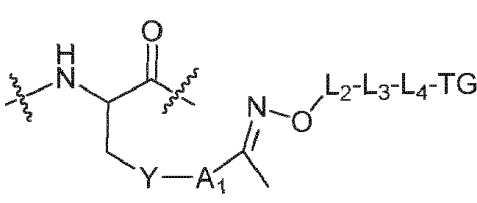
En ciertas realizaciones de los métodos de dos etapas descritos en el presente documento, el anticuerpo modificado o fragmento del mismo se pone en contacto con un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (D), Fórmula (E), Fórmula (F) o Fórmula (G) y una enzima 4'-fosfopanteteinil transferasa que se coexpresa en la misma célula que el anticuerpo modificado expresado o su fragmento. En ciertas realizaciones de los métodos de dos etapas descritos en el presente documento, el anticuerpo modificado o fragmento del mismo se pone en contacto en el medio de cultivo celular con un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (D), Fórmula (E), Fórmula (F) o Fórmula (G) y la enzima 4'-fosfopanteteinil transferasa producida en la misma célula o en otra. En ciertas realizaciones de los métodos de dos etapas descritos en el presente documento, la enzima 4'-fosfopanteteinil transferasa se inmoviliza sobre un soporte sólido. En ciertas realizaciones, el soporte sólido está compuesto opcionalmente de un polímero sobre una perla o una columna.

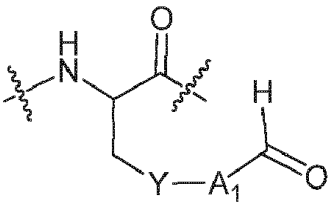
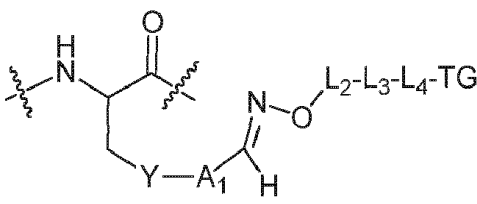
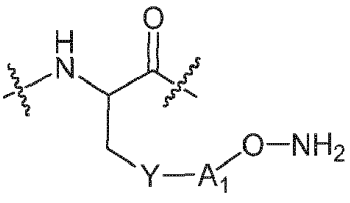
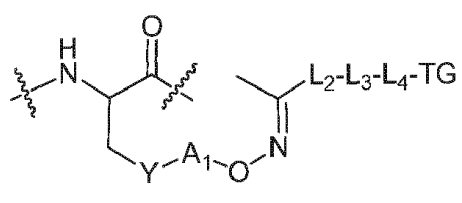
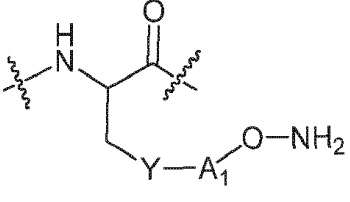
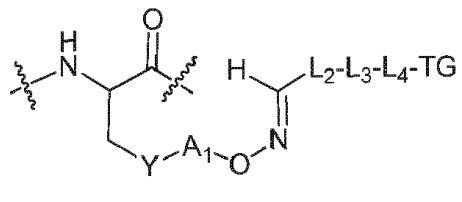
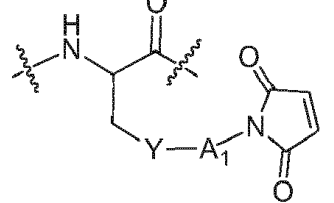
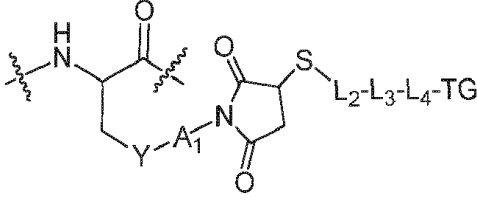
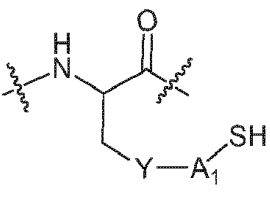
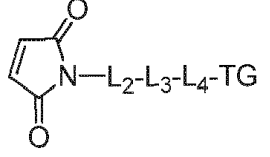
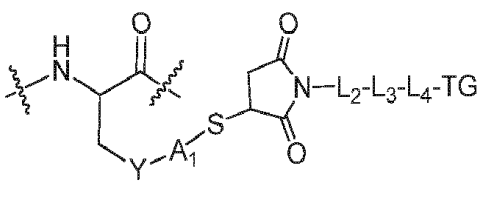
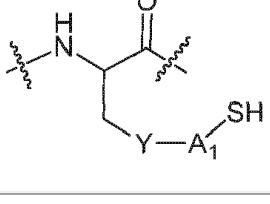
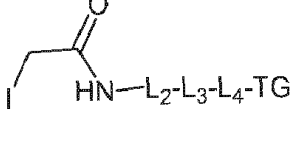
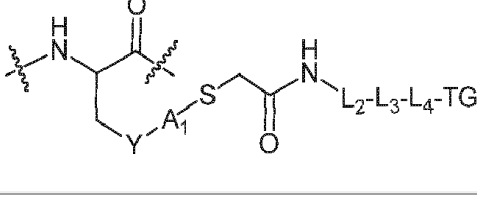
La Tabla 4 muestra ciertas realizaciones de los grupos 4'-fosfopanteninil activados de Fórmula (D-a) y compuestos de Fórmula (II-a) utilizados en los métodos de dos etapas y los métodos de tres etapas descritos aquí y la serina modificada resultante. Ubicados en el anticuerpo modificado o fragmento del mismo. Nota A₁, L₂, L₃, L₄, R₅, R₆, R₇, R₈ y TG son como se definen aquí, e Y es

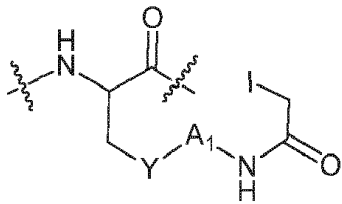
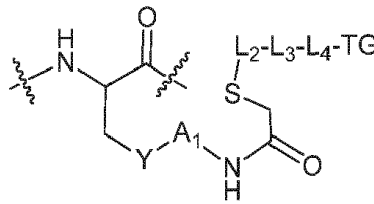
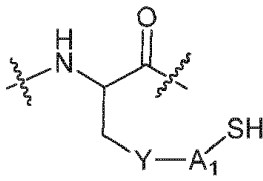
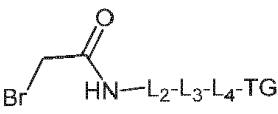
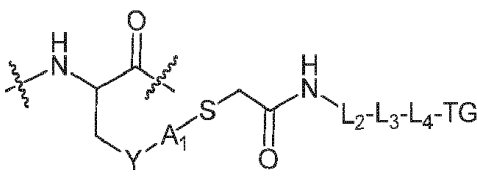
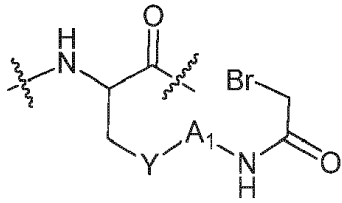
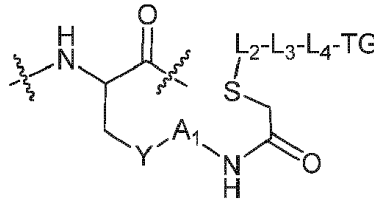
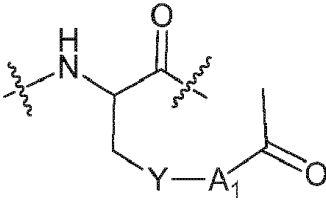
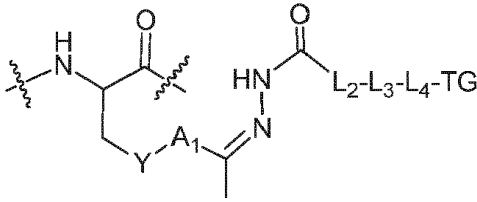
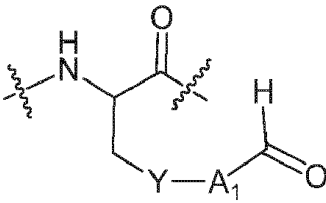
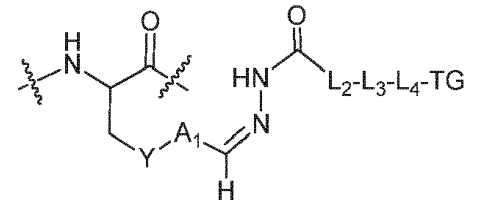
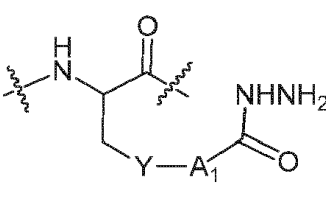
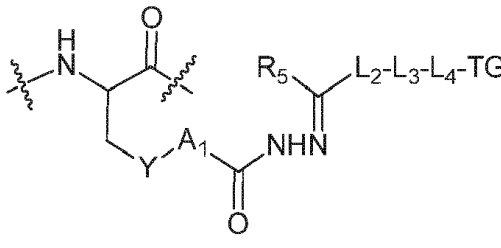


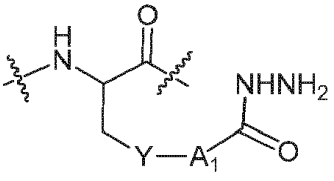
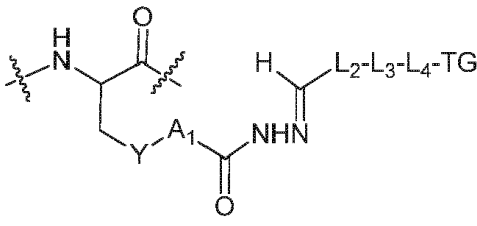
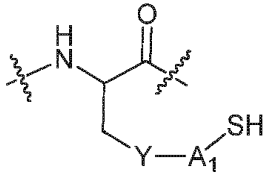
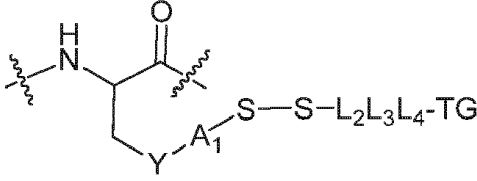
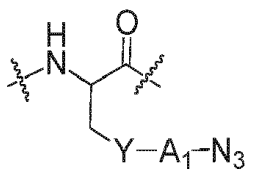
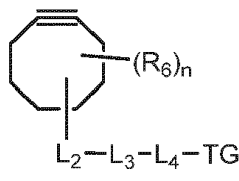
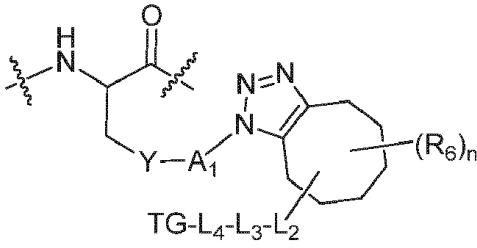
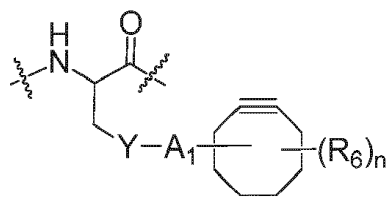
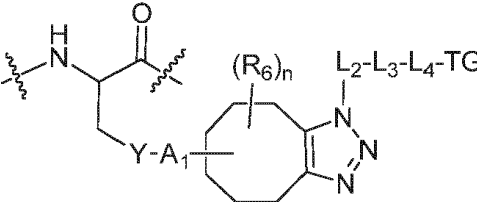
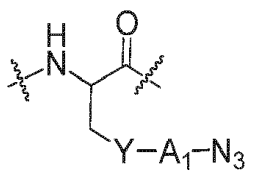
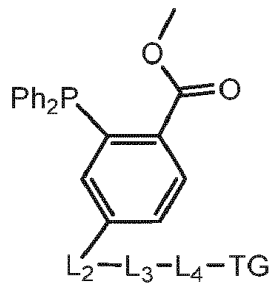
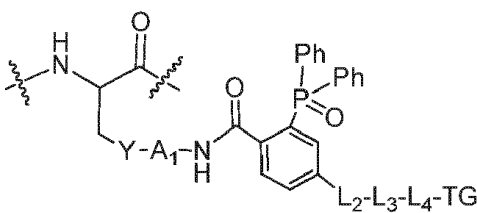
25

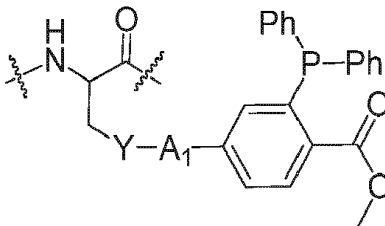
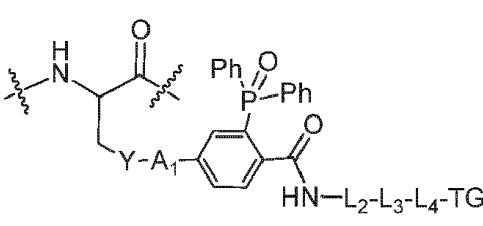
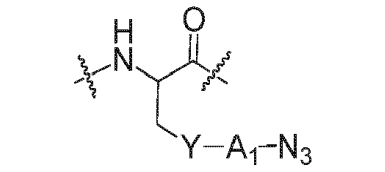
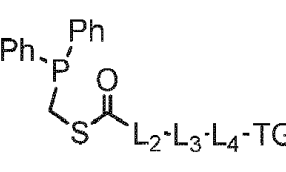
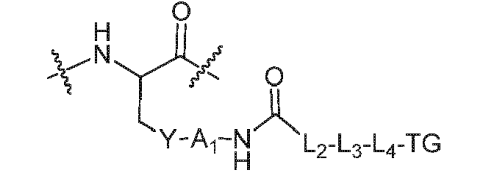
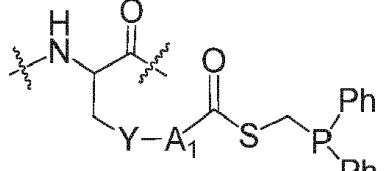
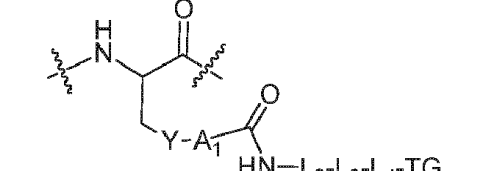
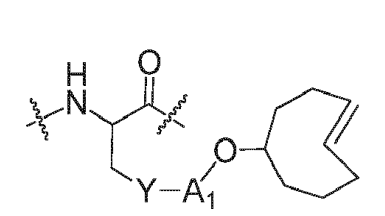
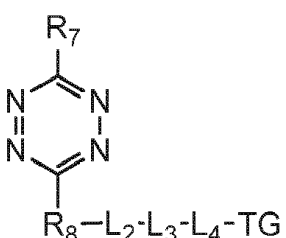
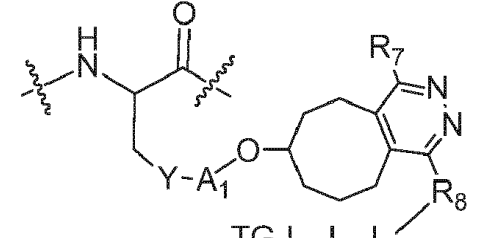
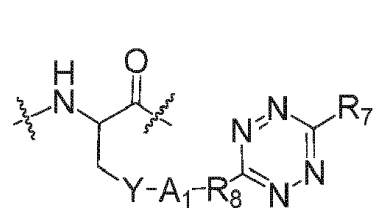
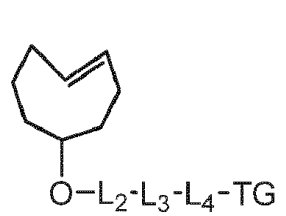
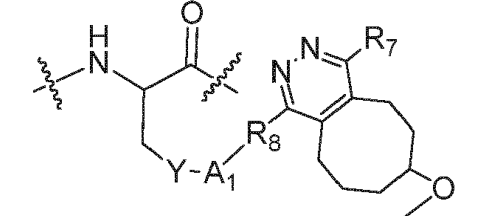
Tabla 4

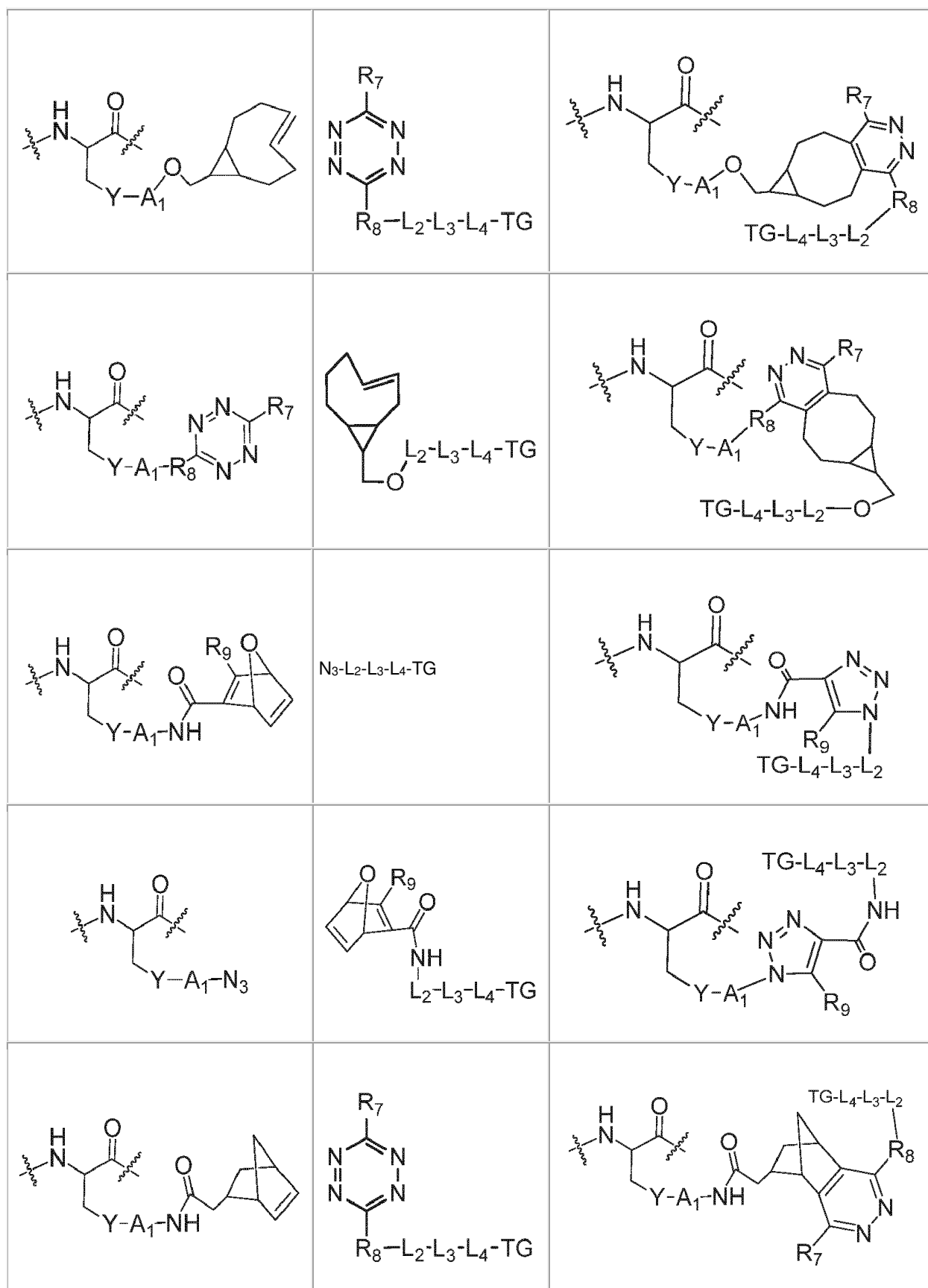
	X-L ₂ -L ₃ -L ₄ -TG Fórmula (IIa)	
	HC=C-L ₂ -L ₃ -L ₄ -TG	
	HC≡C-L ₂ -L ₃ -L ₄ -TG	
	N ₃ -L ₂ -L ₃ -L ₄ -TG	
	N ₃ -L ₂ -L ₃ -L ₄ -TG	
	NH ₂ -O-L ₂ -L ₃ -L ₄ -TG	

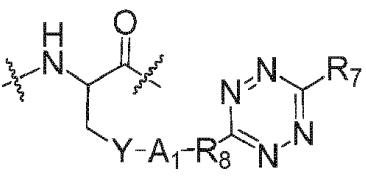
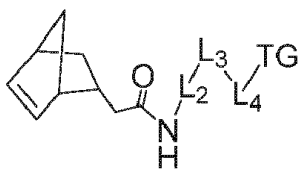
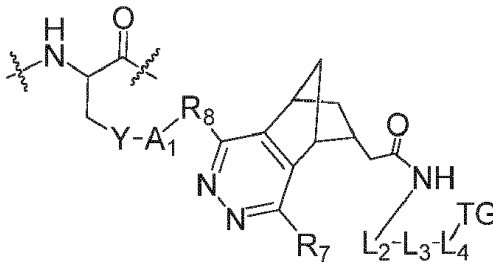
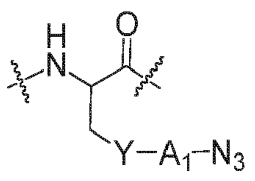
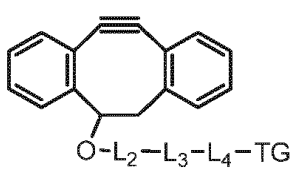
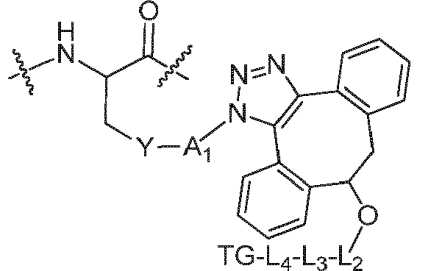
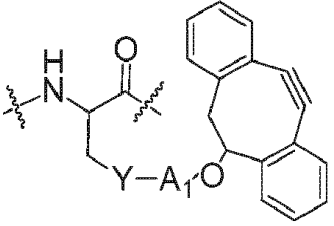
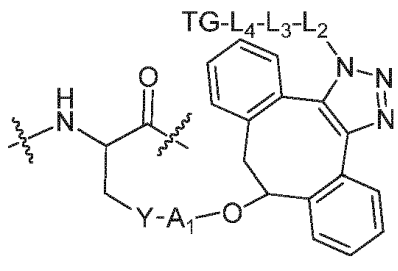
	$\text{NH}_2\text{-O-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
	$\text{CH}_3\text{C(=O)-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
	$\text{HC(=O)-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
	$\text{HS-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
		
		

	$\text{HS-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
		
	$\text{HS-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
	$\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
	$\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
	$\text{R}_5\text{C(=O)-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	

	$\text{HC(=O)}-\text{L}_2-\text{L}_3-\text{L}_4-\text{TG}$	
	$\text{HS}-\text{L}_2-\text{L}_3-\text{L}_4-\text{TG}$	
		
	$\text{N}_3-\text{L}_2-\text{L}_3-\text{L}_4-\text{TG}$	
		

	$N_3-L_2-L_3-L_4-TG$	
		
	$N_3-L_2-L_3-L_4-TG$	
		
		



		
		
	$N_3-L_2-L_3-L_4-TG$	

La Tabla 5 muestra ciertas formas de realización de los grupos 4'-fosfopanteteinilo activados de Fórmula (E-a) y compuestos de Fórmula (II-c) utilizados en los métodos de dos etapas y los métodos de tres etapas descritos en este documento y la serina modificada resultante ubicada en el anticuerpo modificado o fragmento del mismo. Nótese que L_1 , A_2 , L_3 , L_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 y TG son como se definen aquí, e Y es

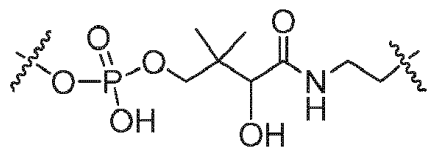
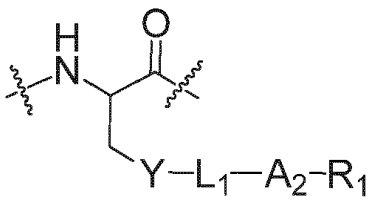
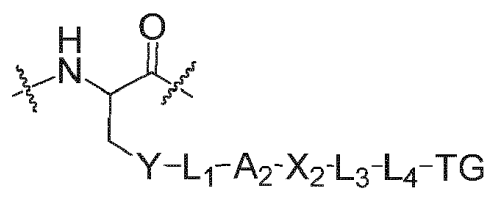
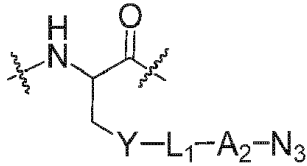
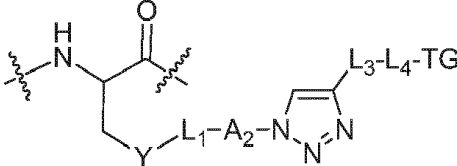
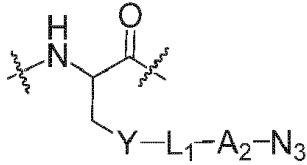
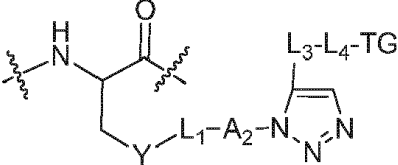
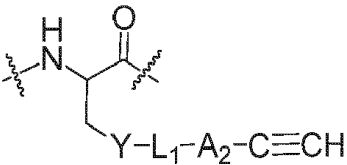
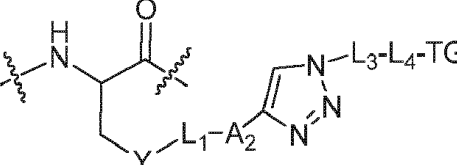
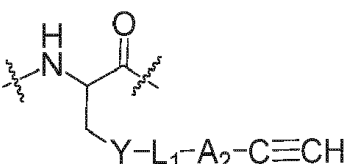
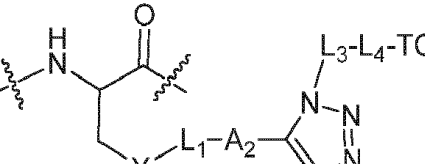
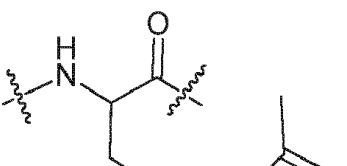
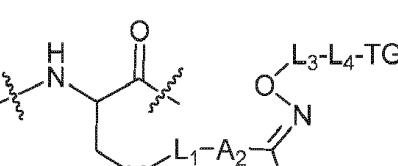
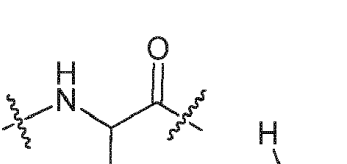
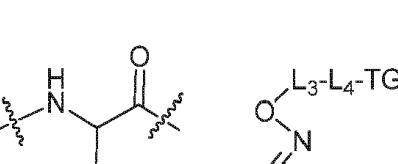
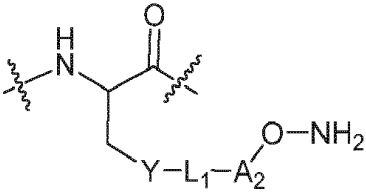
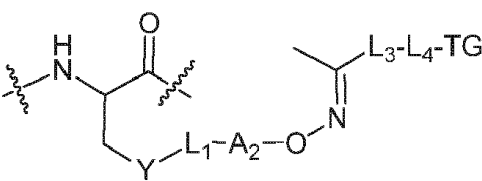
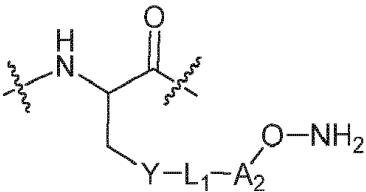
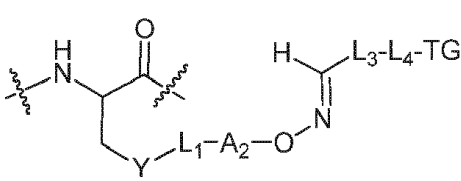
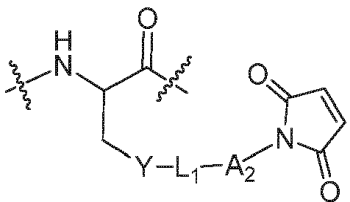
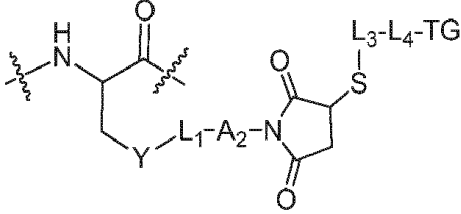
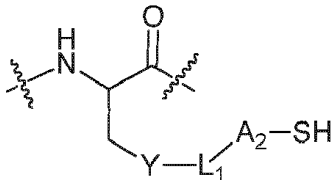
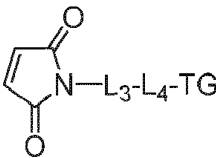
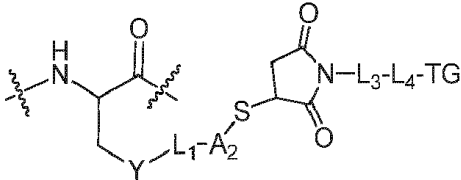
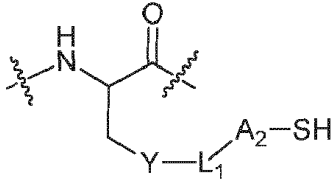
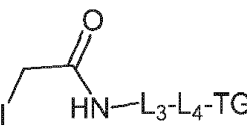
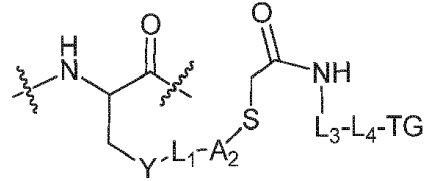
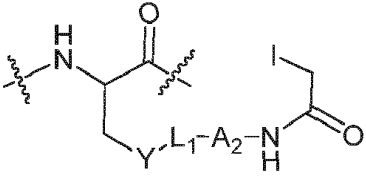
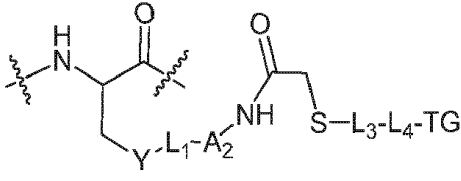
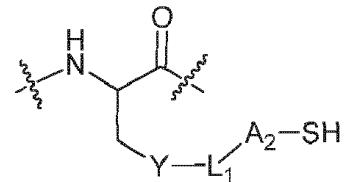
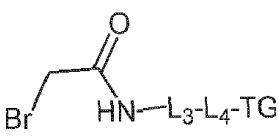
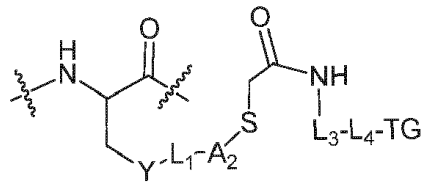
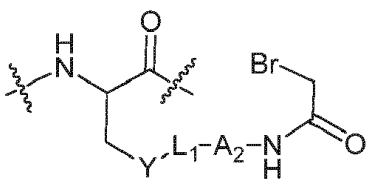
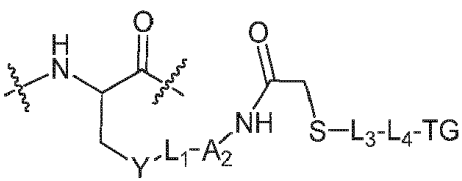
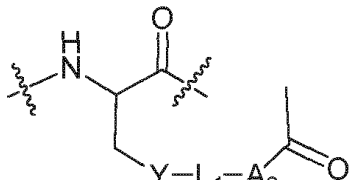
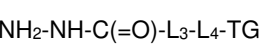
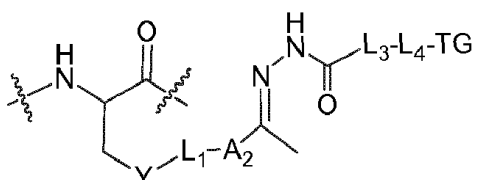
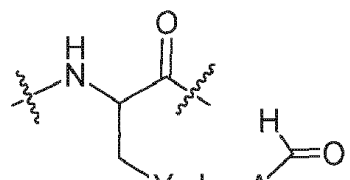
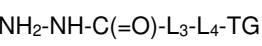
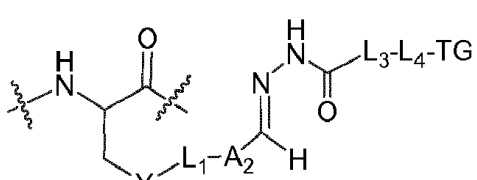
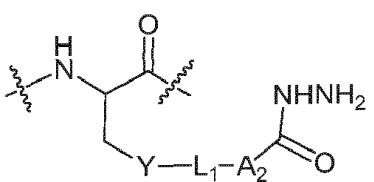
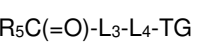
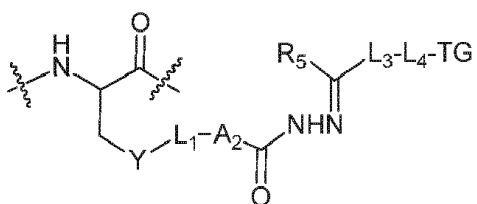
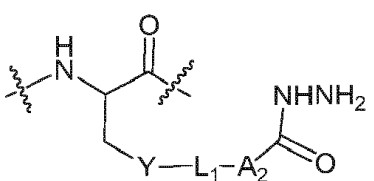
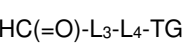
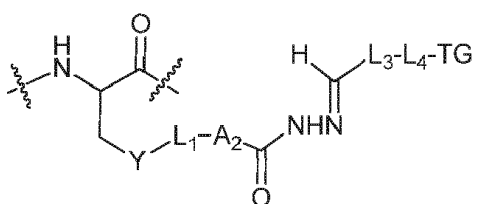


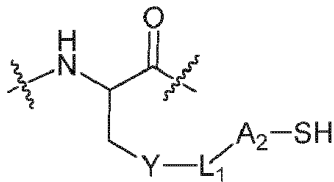
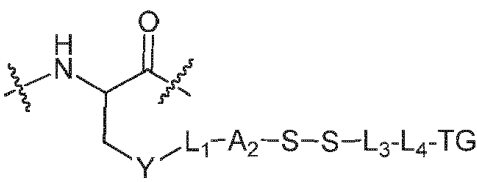
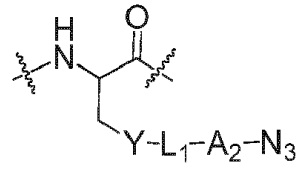
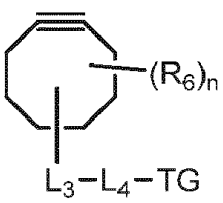
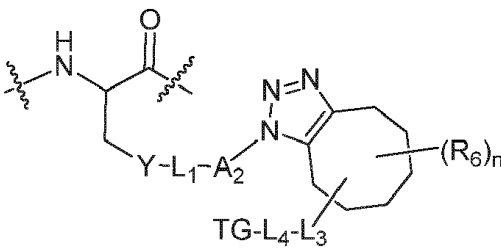
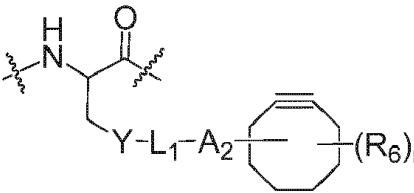
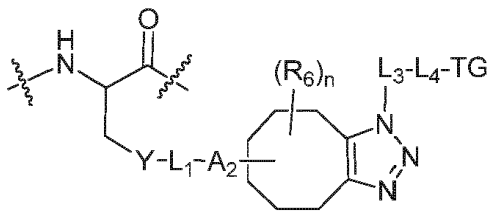
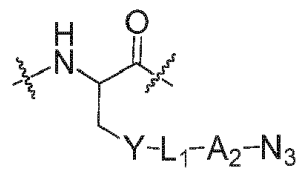
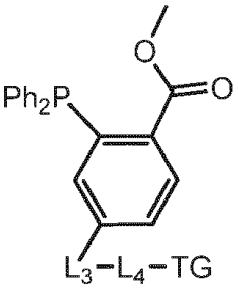
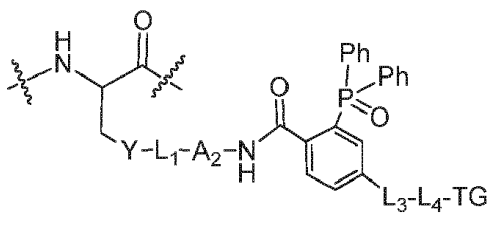
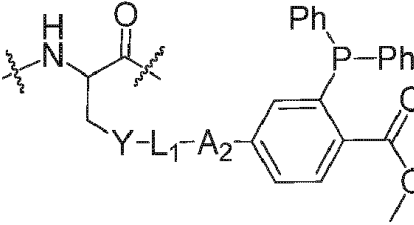
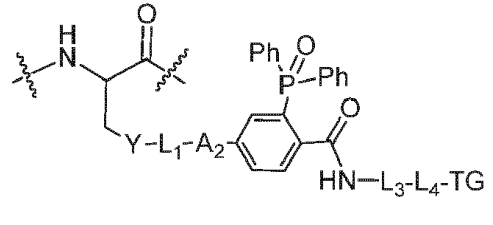
Tabla 5

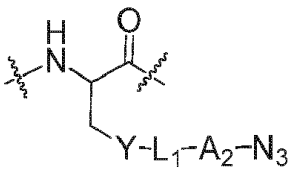
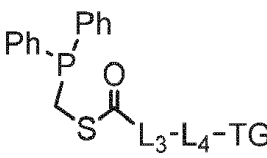
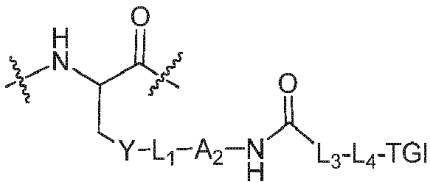
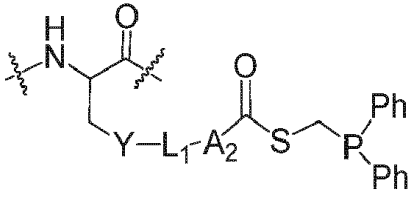
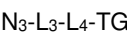
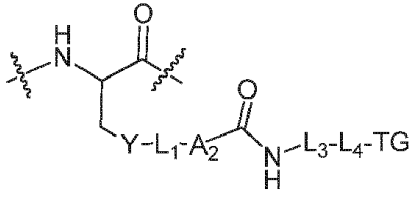
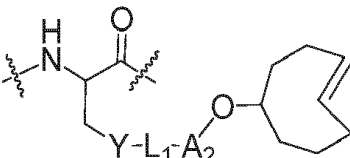
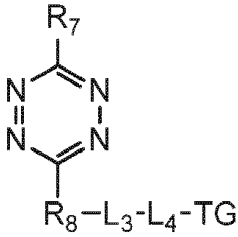
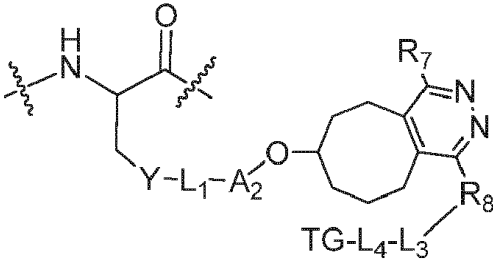
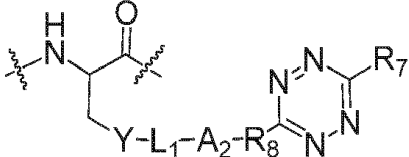
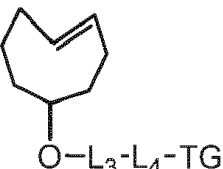
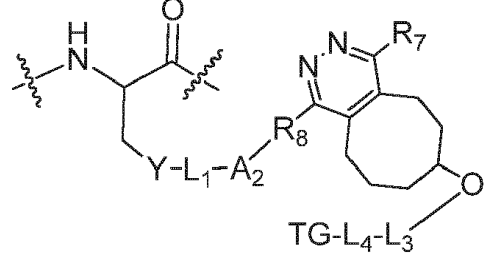
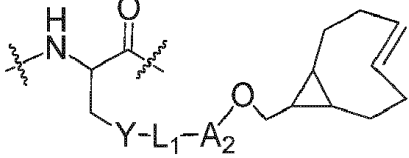
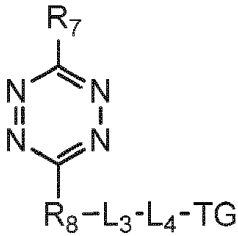
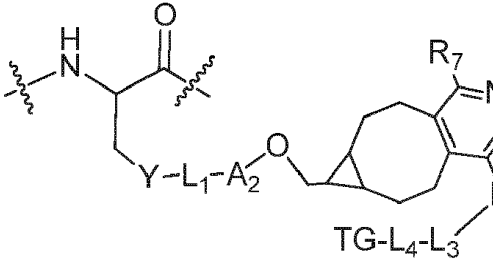
	$X-L_3-L_4-TG$ Fórmula (II-c)	
---	-------------------------------	--

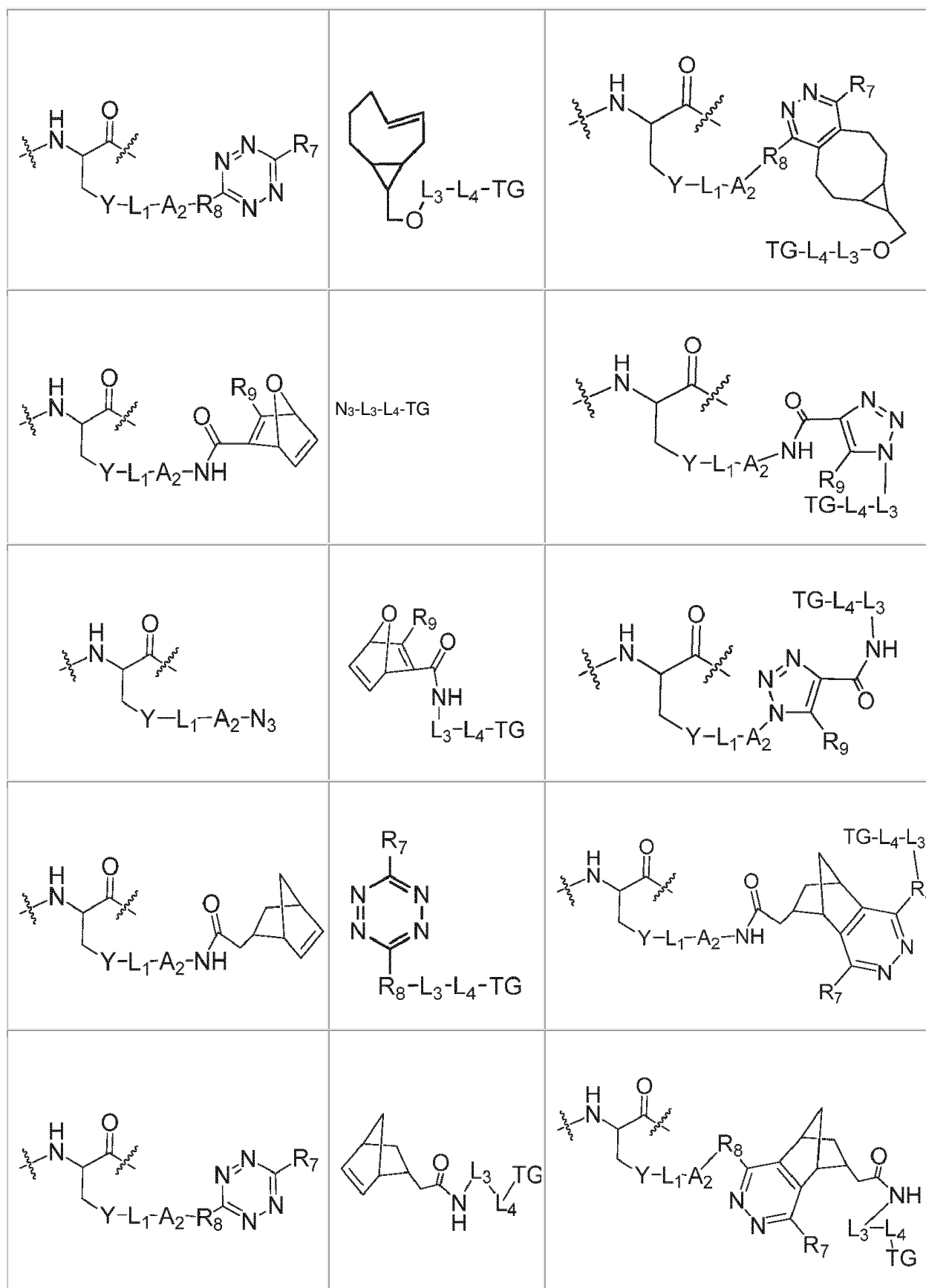
	$\text{HC}\equiv\text{C}-\text{L}_3-\text{L}_4-\text{TG}$	
	$\text{HC}\equiv\text{C}-\text{L}_3-\text{L}_4-\text{TG}$	
	$\text{N}_3-\text{L}_3-\text{L}_4-\text{TG}$	
	$\text{N}_3-\text{L}_3-\text{L}_4-\text{TG}$	
	$\text{NH}_2-\text{O}-\text{L}_3-\text{L}_4-\text{TG}$	
	$\text{NH}_2-\text{O}-\text{L}_3-\text{L}_4-\text{TG}$	

	$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
	$\text{HC}(=\text{O})\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
	$\text{HS-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
		
		
	$\text{HS-L}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	

	SH-L₃-L₄-TG	
		
	N₃-L₃-L₄-TG	
		
	N₃-L₃-L₄-TG	



	$N_3-L_3-L_4-TG$	

La Tabla 6 muestra ciertas realizaciones de los grupos 4'-fosfopanteteinilo activados de Fórmula (F-a) y compuestos de Fórmula (II-e) utilizados en los métodos de dos etapas y los métodos de tres etapas descritos en este documento y la serina modificada resultante ubicada en el anticuerpo modificado o fragmento del mismo. Nótese que L₁, L₂, A₃, L₄, R₅, R₆, R₇, R₈ y TG son como se definen aquí, e Y es

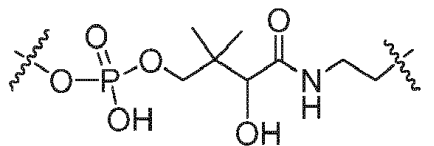
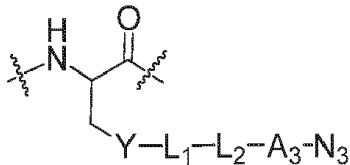
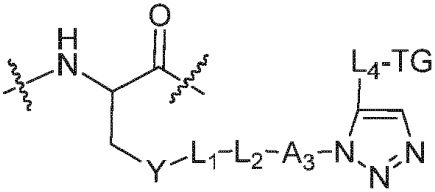
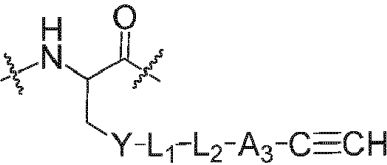
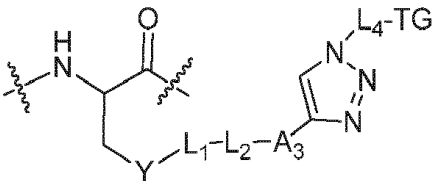
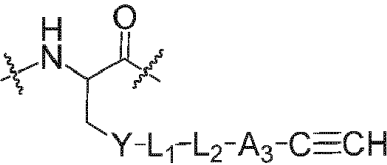
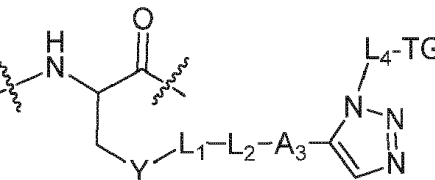
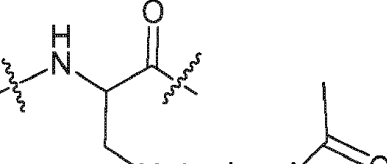
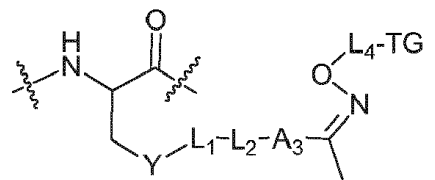
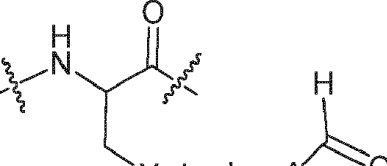
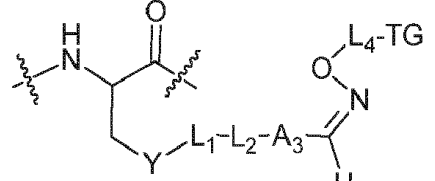
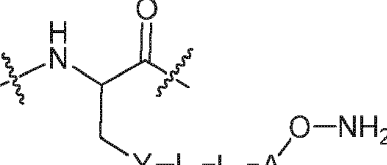
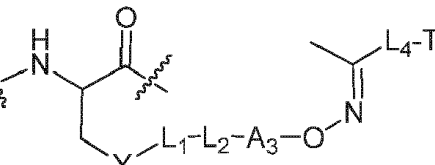
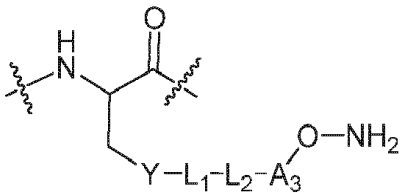
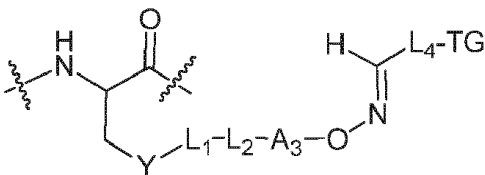
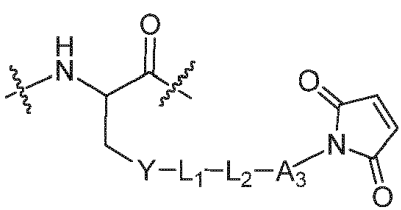
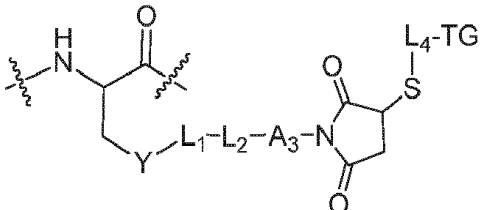
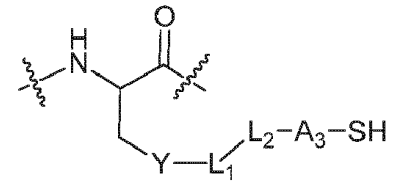
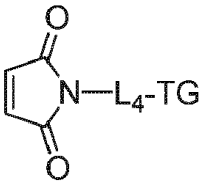
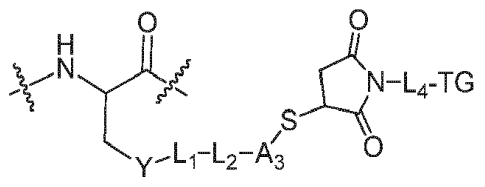
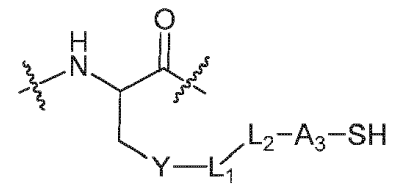
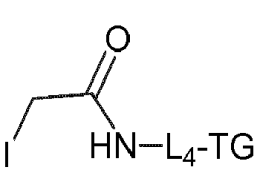
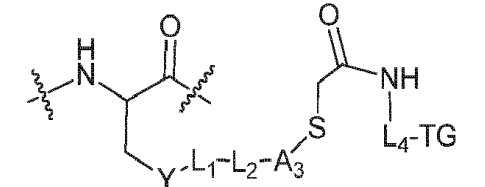
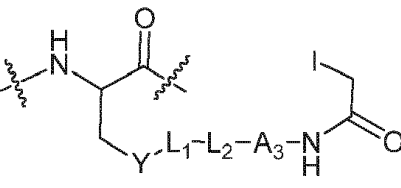
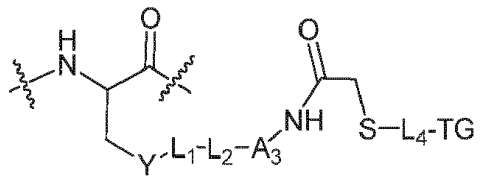
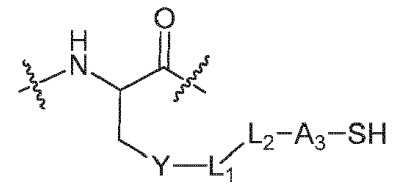
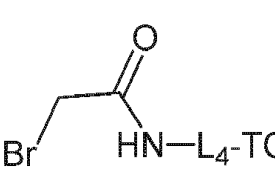
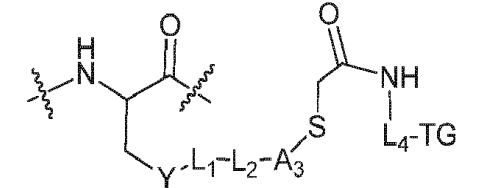


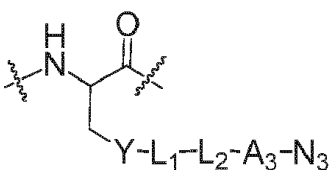
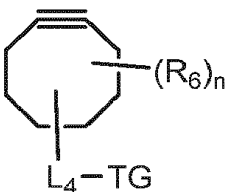
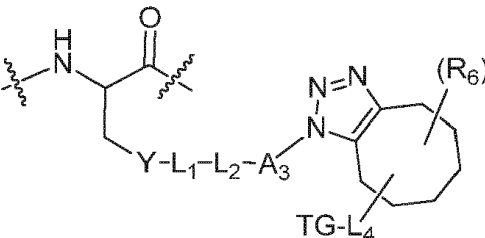
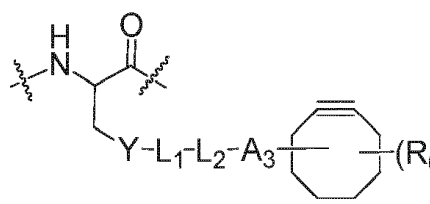
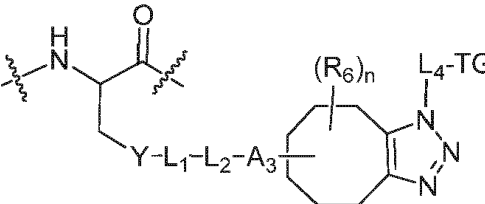
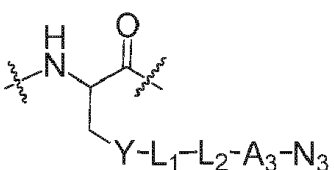
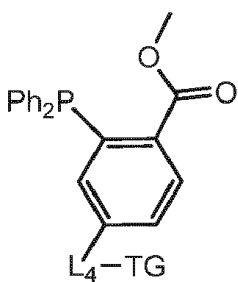
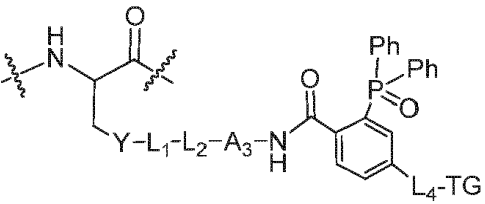
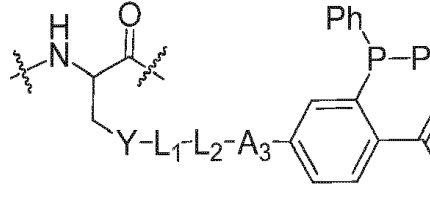
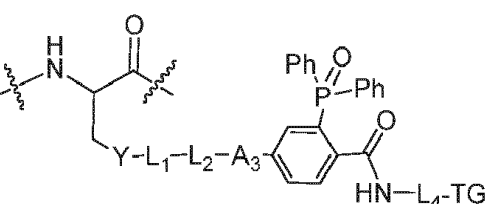
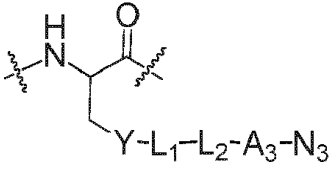
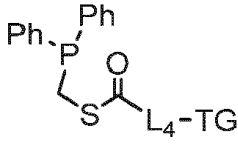
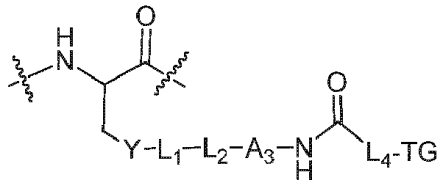
Tabla 6

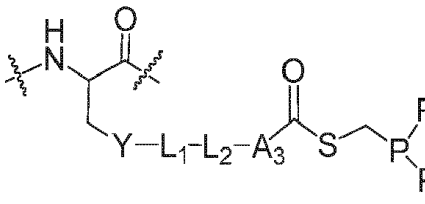
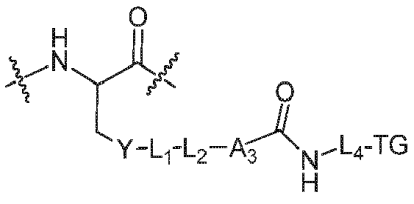
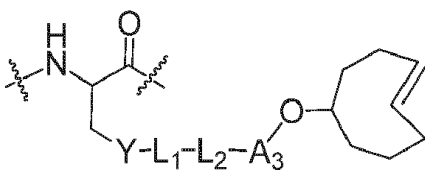
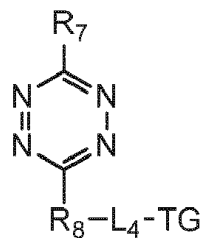
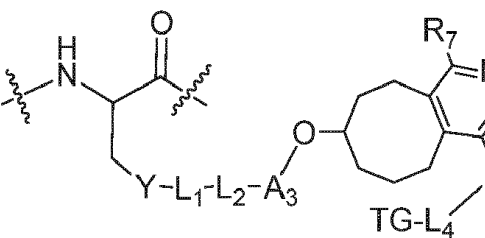
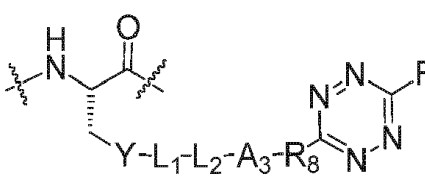
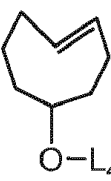
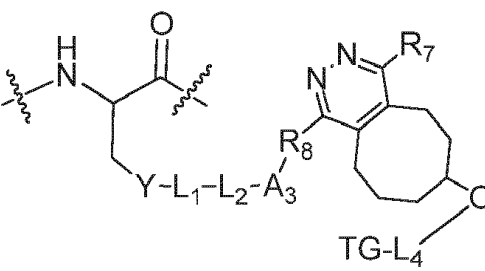
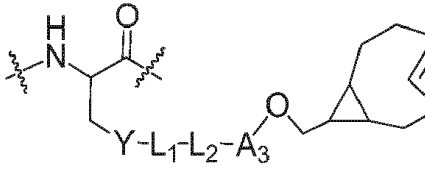
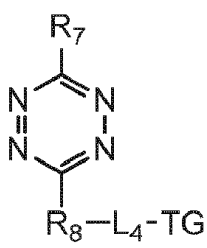
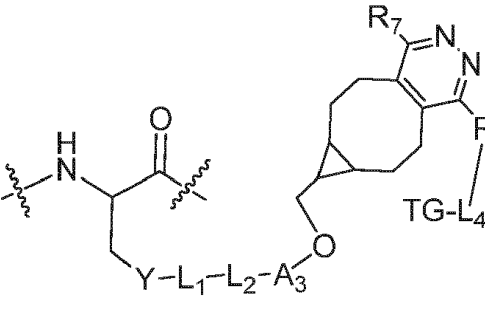
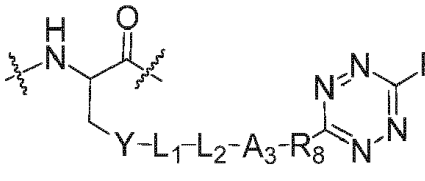
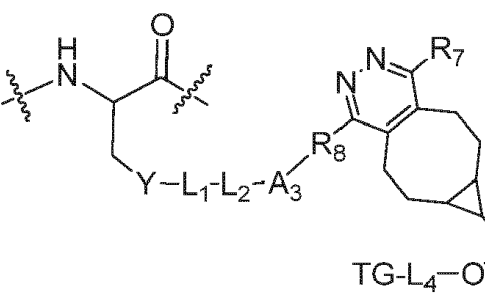
	X-L ₄ -TG Fórmula (II-e)	
	HC≡C-L ₄ -TG	

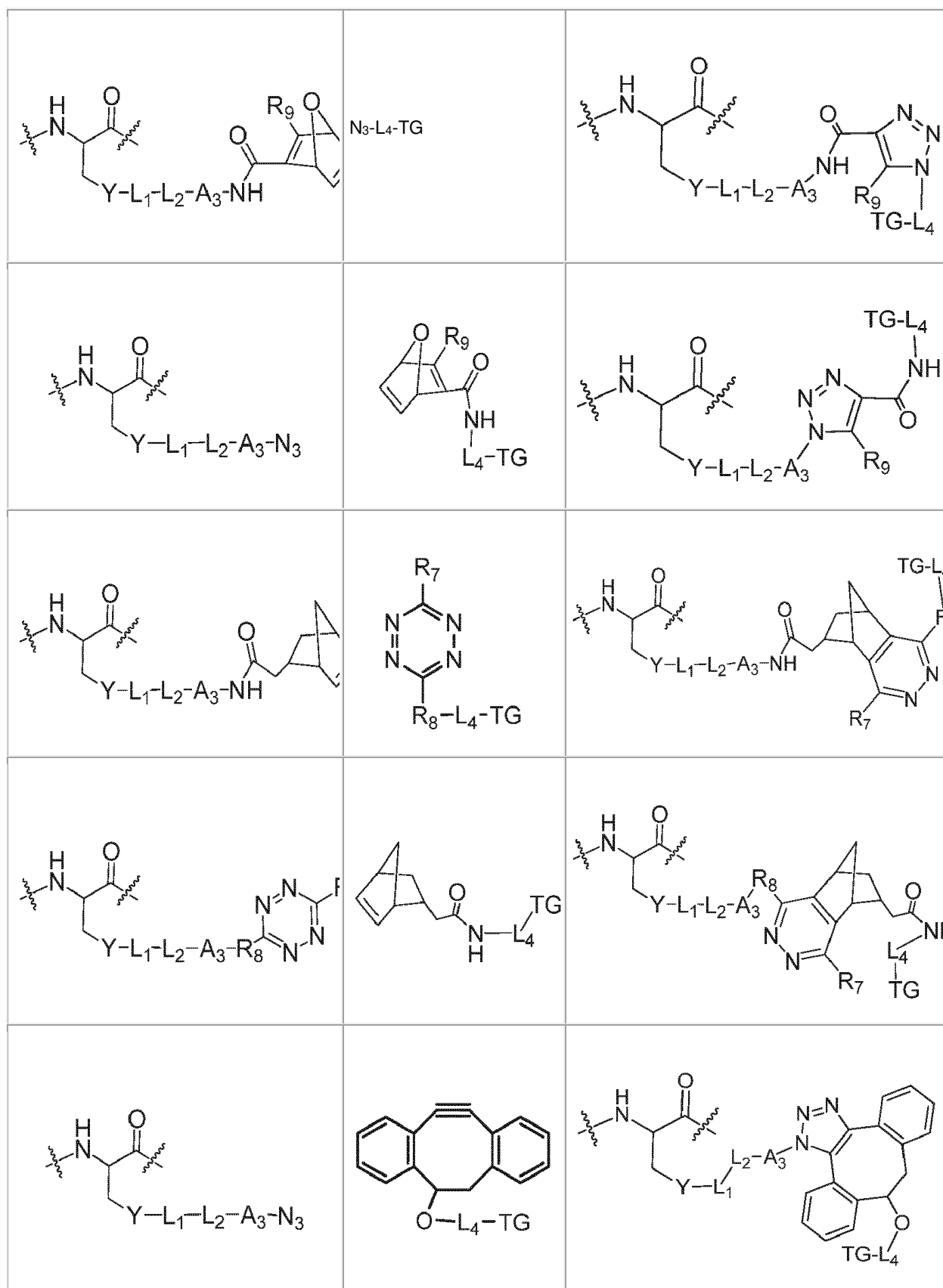
 $\text{Y-L}_1\text{-L}_2\text{-A}_3\text{-N}_3$	$\text{HC}\equiv\text{C-L}_4\text{-TG}$	
 $\text{Y-L}_1\text{-L}_2\text{-A}_3\text{-C}\equiv\text{CH}$	$\text{N}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
 $\text{Y-L}_1\text{-L}_2\text{-A}_3\text{-C}\equiv\text{CH}$	$\text{N}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
 $\text{Y-L}_1\text{-L}_2\text{-A}_3\text{-C(=O)CH}_3$	$\text{NH}_2\text{-O-L}_4\text{-TG}$	
 $\text{Y-L}_1\text{-L}_2\text{-A}_3\text{-CHO}$	$\text{NH}_2\text{-O-L}_4\text{-TG}$	
 $\text{Y-L}_1\text{-L}_2\text{-A}_3\text{-O-NH}_2$	$\text{CH}_3\text{C(=O)-L}_4\text{-TG}$	

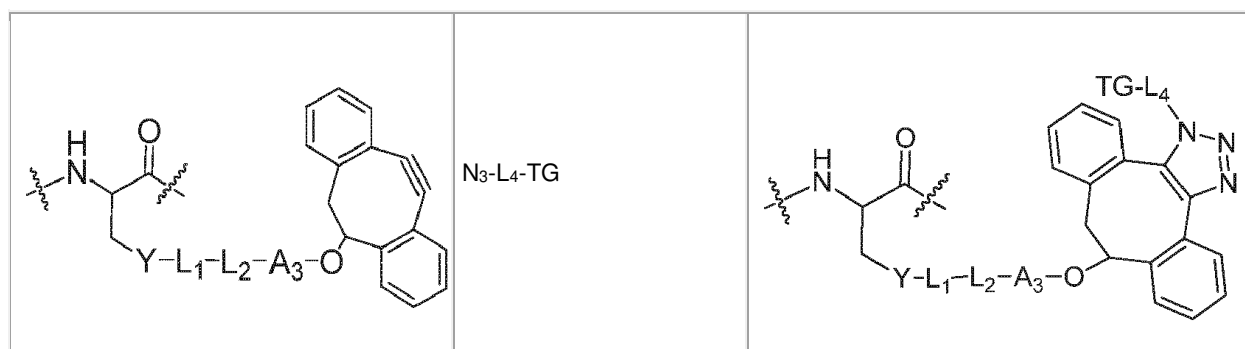
	$\text{HC(=O)-L}_4\text{-TG}$	
	$\text{HS-L}_4\text{-TG}$	
		
		
	$\text{HS-L}_4\text{-TG}$	
		

	HS-L ₄ -TG	
	NH ₂ -NH-C(=O)-L ₄ -TG	
	NH ₂ -NH-C(=O)-L ₄ -TGI	
	R ₅ C(=O)-L ₄ -TG	
	HC(=O)-L ₄ -TG	
	HS-L ₄ -TG	

		
	N₃-L₄-TG	
		
	N₃-L₄-TG	
		

	$\text{N}_3\text{-L}_4\text{-TG}$	
		
		
		
		





La Tabla 7 muestra ciertas realizaciones de los grupos 4'-fosfopanteteinilo activados de Fórmula (G-a) y compuestos de Fórmula (II-g) utilizados en los métodos de dos etapas y los métodos de tres etapas descritos aquí y la serina modificada resultante ubicada en el anticuerpo modificado o fragmento del mismo. Nótese que L_1 , L_2 , L_3 , A_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 y TG son como se definen aquí, e Y es

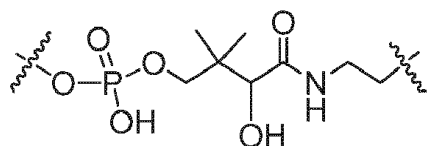
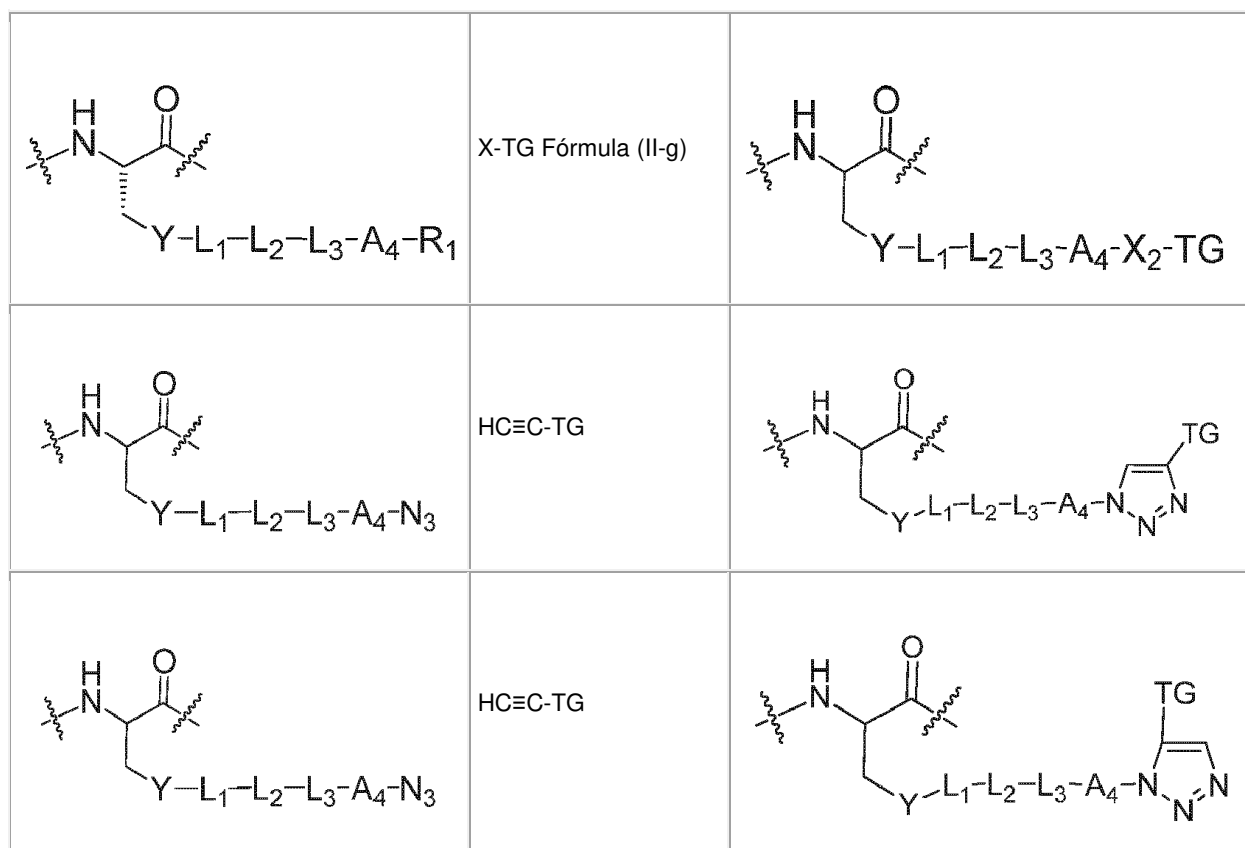
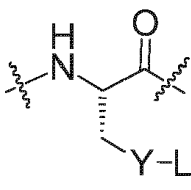
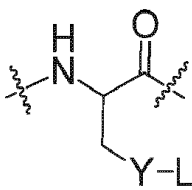
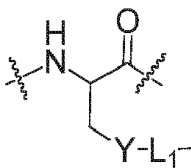
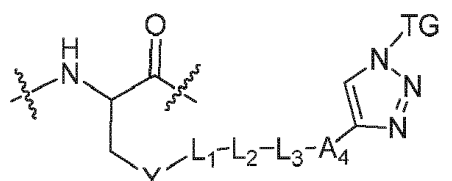
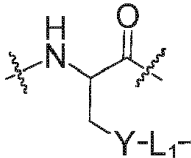
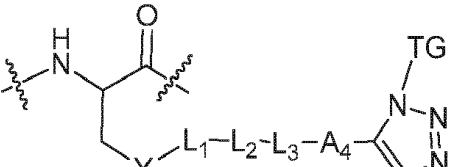
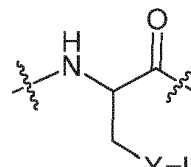
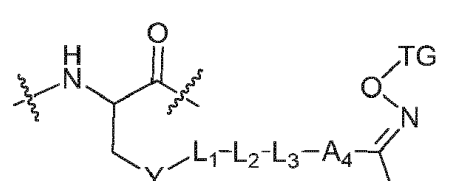
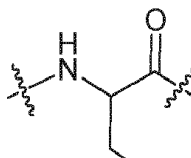
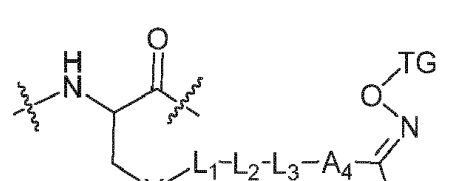
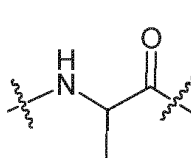
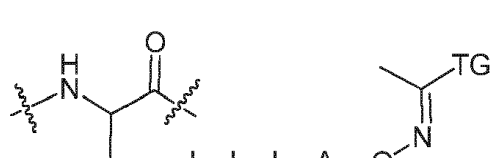
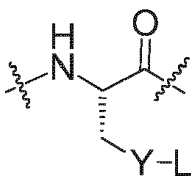
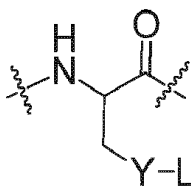
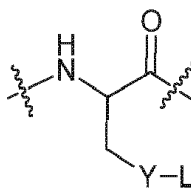
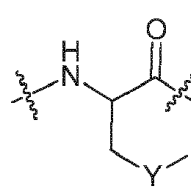
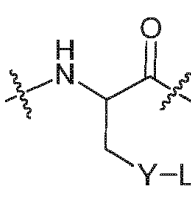
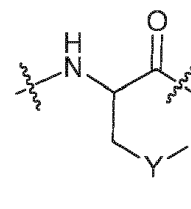
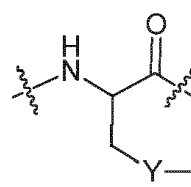
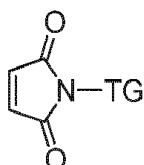
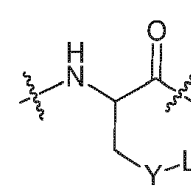
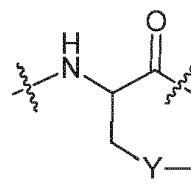
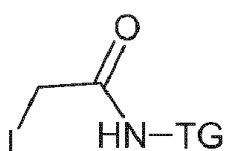
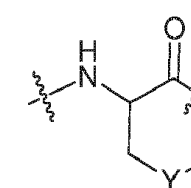
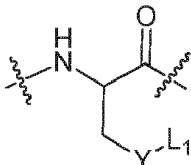
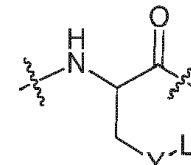
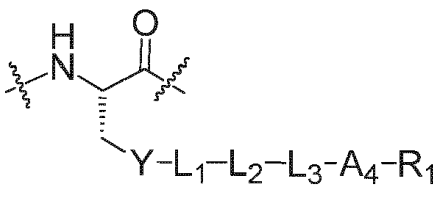
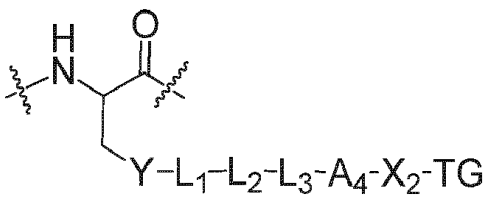
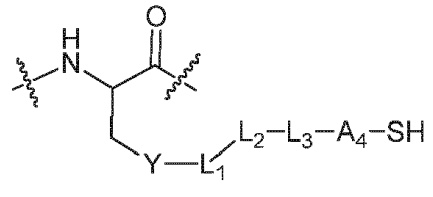
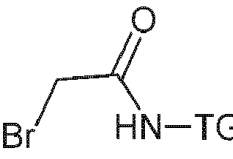
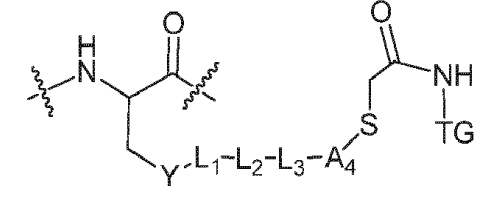
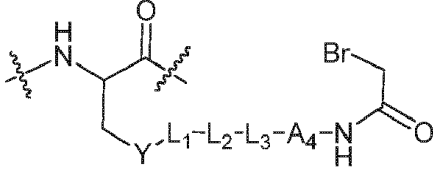
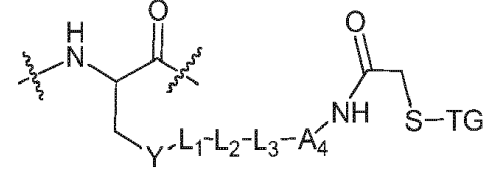
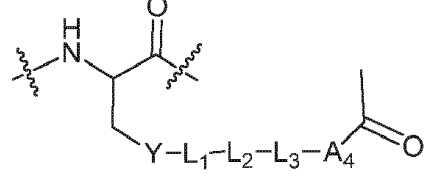
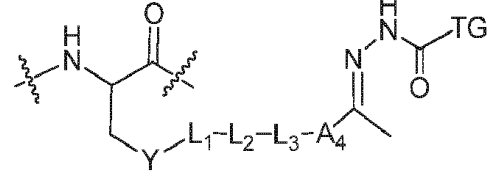
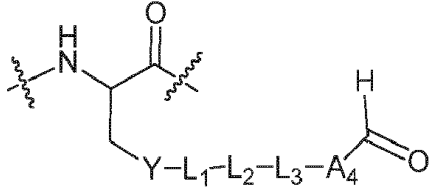
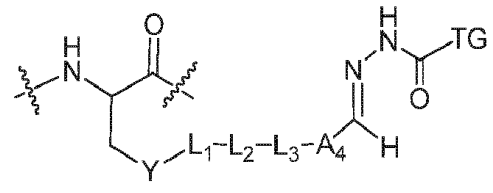
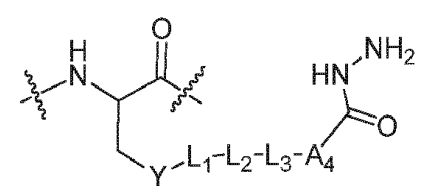
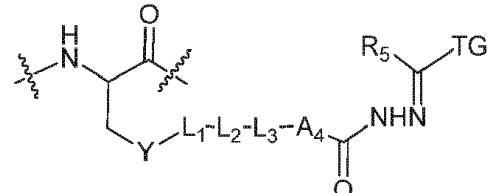


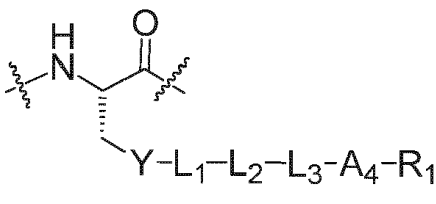
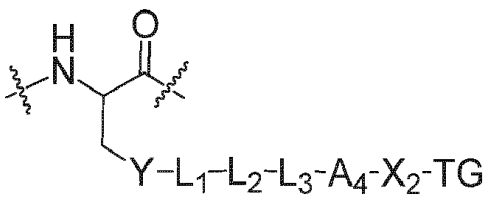
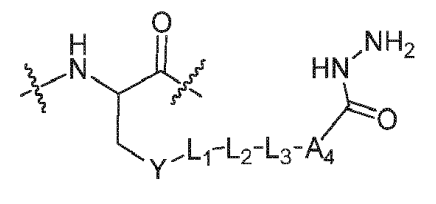
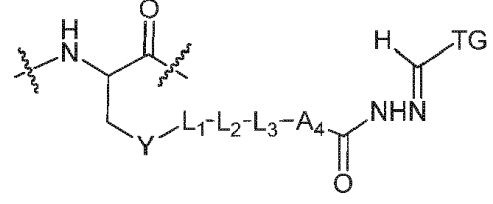
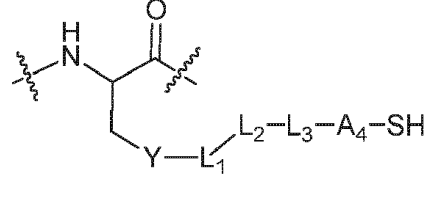
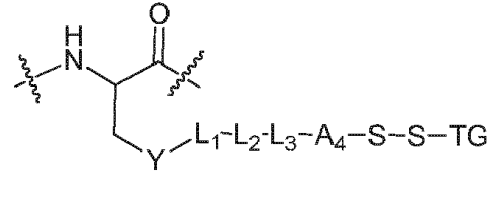
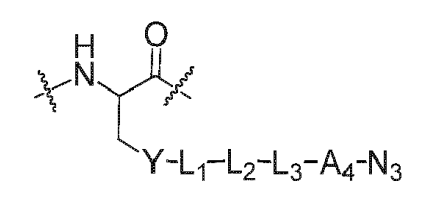
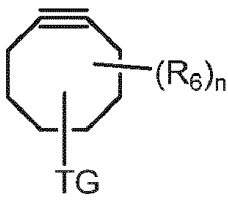
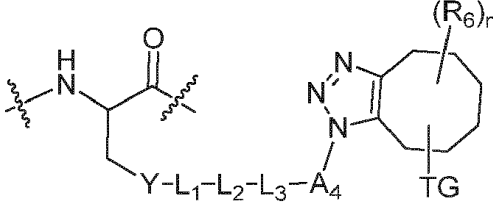
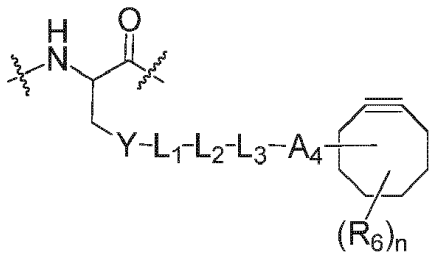
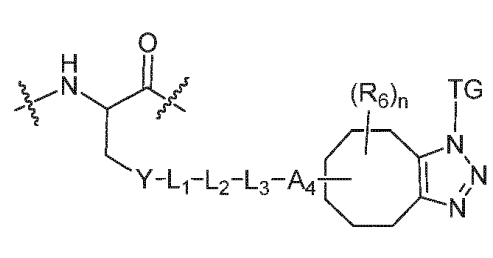
Tabla 7

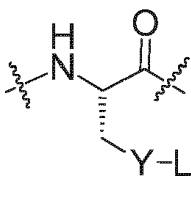
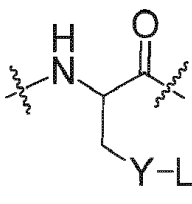
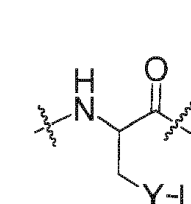
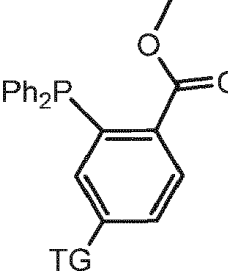
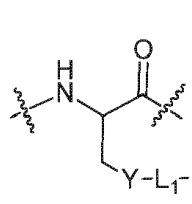
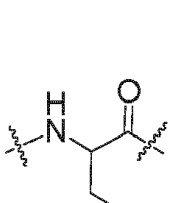
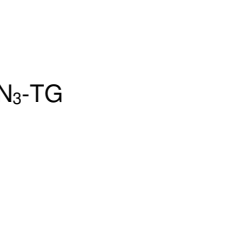
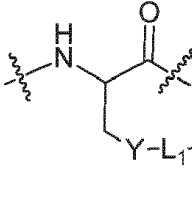
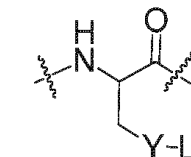
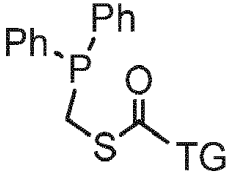
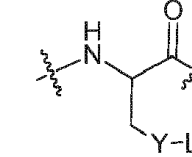
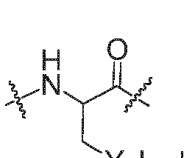
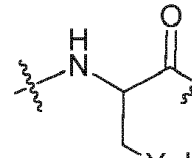


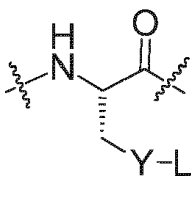
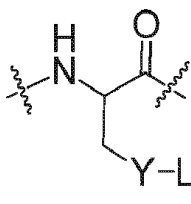
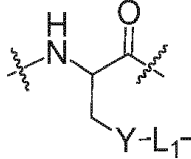
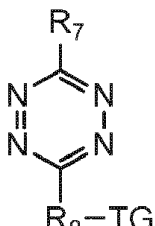
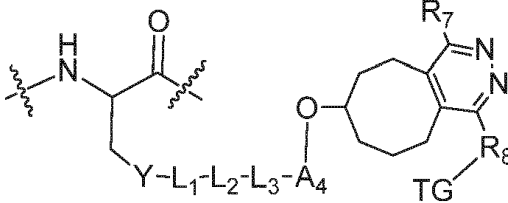
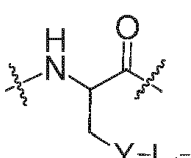
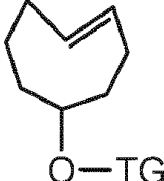
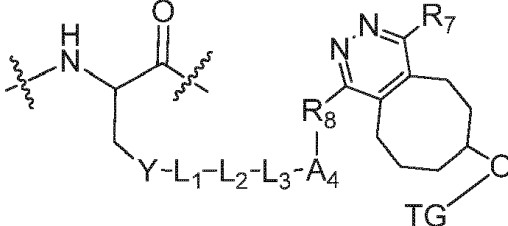
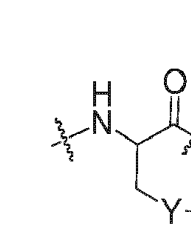
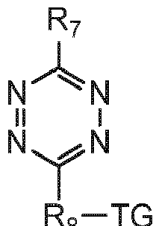
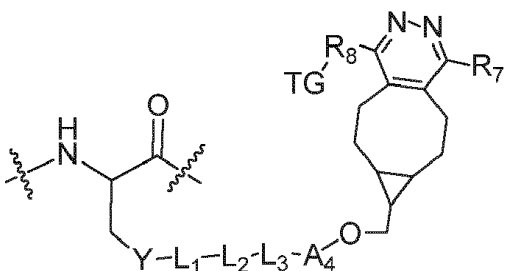
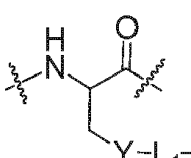
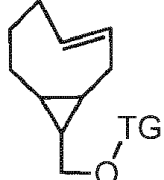
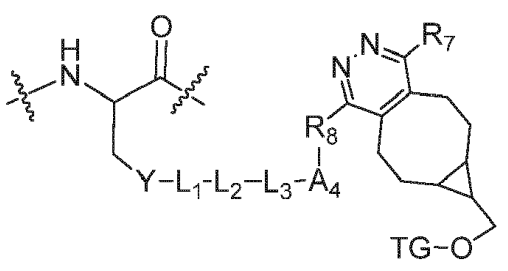
	X-TG Fórmula (II-g)	
	N ₃ -TG	
	N ₃ -TG	
	NH ₂ -O-TG	
	NH ₂ -O-TG	
	CH ₃ C(=O)-TG	

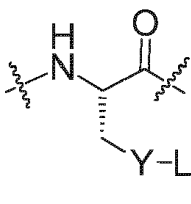
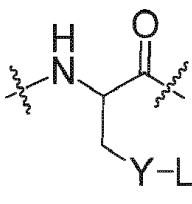
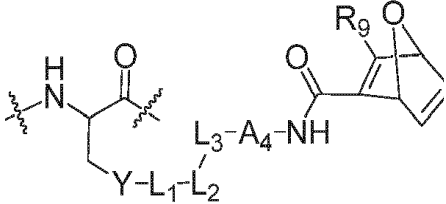
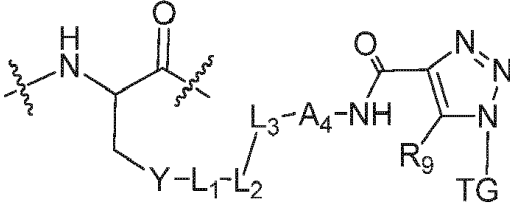
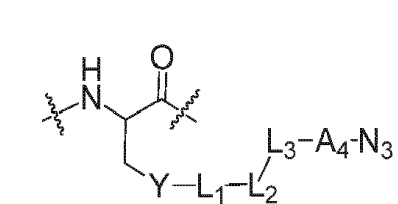
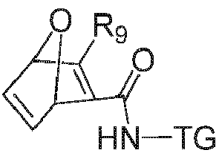
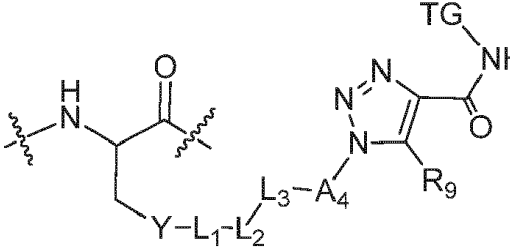
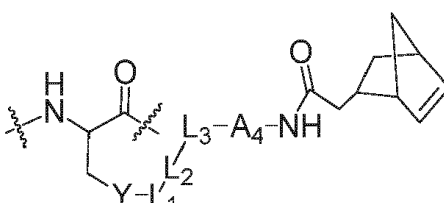
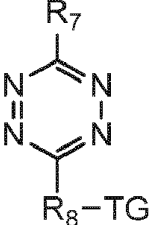
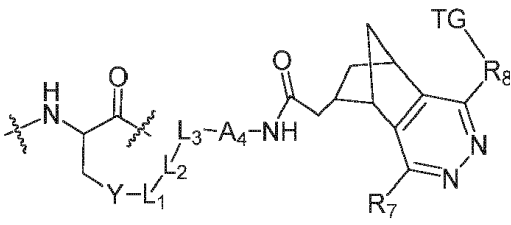
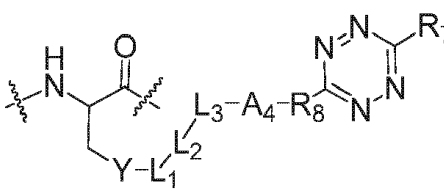
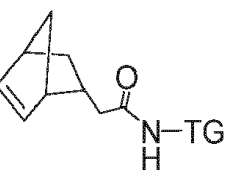
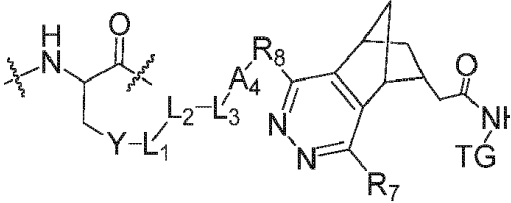
	X-TG Fórmula (II-g)	
	HC(=O)-TG	
	HS-TG	
		
		
	HS-TG	

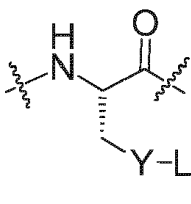
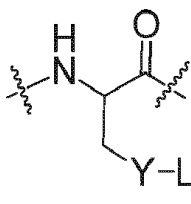
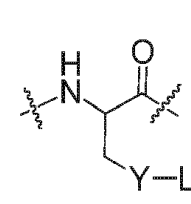
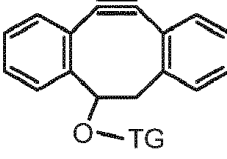
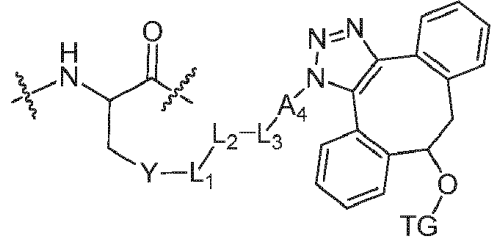
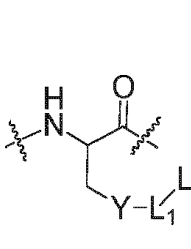
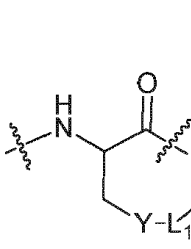
	X-TG Fórmula (II-g)	
		
	HS-TG	
	NH2-NH-C(=O)-TG	
	NH2-NH-C(=O)-TG	
	R5C(=O)-TG	

	X-TG Fórmula (II-g)	
	HC(=O)-TG	
	HS-TG	
		
	N3-TG	

 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-R₁	X-TG Fórmula (II-g)	 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-X₂-TG
 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-N₃	 TG	 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-NH-CO-Ph-P(Ph)₂-TG
 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-N₃-TG	 N₃-TG	 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-NH-CO-Ph-P(Ph)₂-TG
 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-N₃	 Ph-P(Ph)₂-S-CO-TG	 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-NH-CO-TG
 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-N₃-TG	 N₃-TG	 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-NH-CO-TG

 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-R₁	X-TG Fórmula (II-g)	 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-X₂-TG
 Y-L₁-L₂-L₃-A₄	 R₇ R₈-TG	 Y-L₁-L₂-L₃-A₄ TG
 Y-L₁-L₂-L₃-A₄	 O-TG	 Y-L₁-L₂-L₃-A₄ TG
 Y-L₁-L₂-L₃-A₄	 R₇ R₈-TG	 Y-L₁-L₂-L₃-A₄ TG
 Y-L₁-L₂-L₃-A₄	 TG	 Y-L₁-L₂-L₃-A₄ TG-O

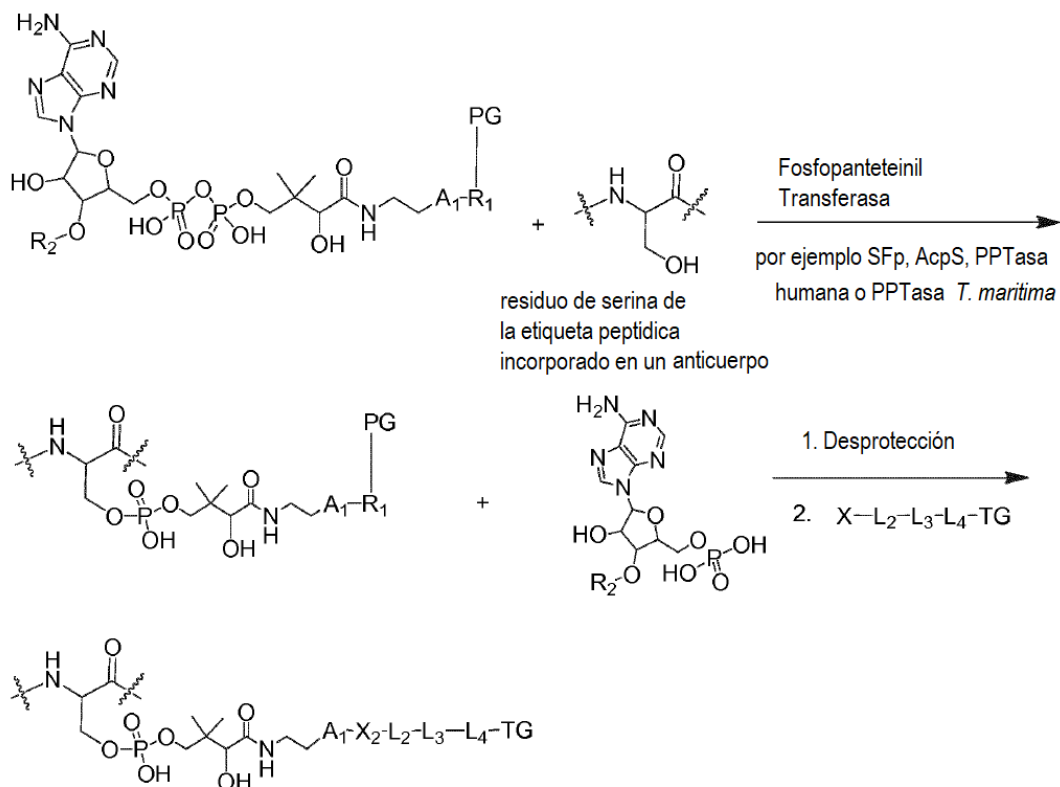
 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-R₁	X-TG Fórmula (II-g)	 Y-L₁-L₂-L₃-A₄-X₂-TG
 N₃-TG		 TG
 N₃	 HN-TG	 TG-NH
	 R₇ R₈-TG	 TG R₈ R₇
 R R₈	 HN-TG	 R₈ R₇ TG

	X-TG Fórmula (II-g)	
		
	N3-TG	

Método de tres etapas

- Alternativamente, los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos proporcionados aquí se marcan específicamente para el sitio mediante un método de tres etapas, en donde, en la primera etapa, un grupo protésico ppan protegido de CoA, o un grupo protésico ppan modificado protegido del análogo de CoA, se une a la etiqueta peptídica corta mediante un enlace fosfodiéster formado entre la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo y el grupo hidroxilo del residuo de serina conservado de la etiqueta peptídica corta incorporada en el anticuerpo. En el segundo paso, el grupo protésico ppan protegido de CoA, se desprotege el grupo protésico ppan modificado protegido del análogo de CoA, generando así un grupo funcional reactivo (R₁). En la tercera etapa, un grupo terminal (TG) unido o directamente unido a un grupo que es reactivo con el grupo funcional (R₁) se hace reaccionar con el grupo funcional (R₁) en el grupo protésico ppan de CoA, o en el grupo protésico ppan modificado del análogo de CoA, que de este modo une directamente el grupo terminal al anticuerpo modificado o fragmento del mismo o une el grupo terminal al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de una Unidad enlazadora (LU).

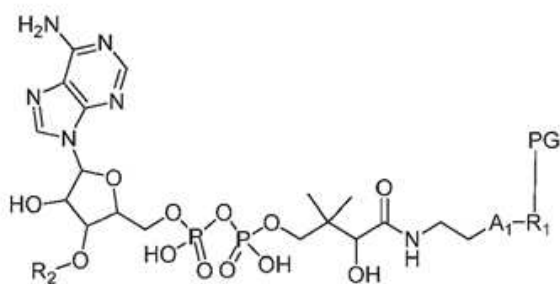
Una realización del método de tres etapas se muestra en el esquema (IIIa).

Esquema (IIIa)

en donde X y un R₁ correspondiente son como se dan en la Tabla 3, y donde PG es un grupo protector y R₂, A₁, L₂, X₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

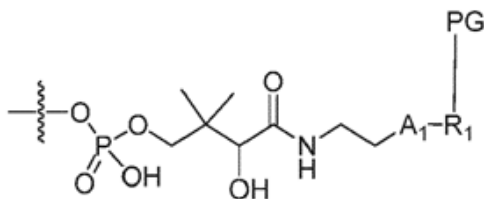
El método de tres etapas del esquema (IIIa) incluye las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo que ha sido diseñado para contener una etiqueta peptídica corta, y en donde la etiqueta peptídica es un sustrato de una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa;
- (b) etiquetar el anticuerpo modificado o su fragmento mediante:
- 10 incubar el anticuerpo modificado o un fragmento del mismo con una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa en presencia de un compuesto de Fórmula H,



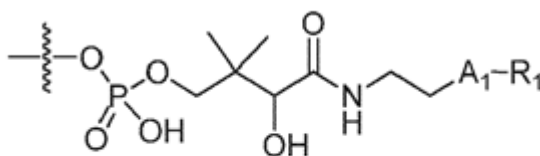
Fórmula (H)

uniendo de este modo un grupo 4'-fosfopanteteinilo protegido de Fórmula (H-a) a la etiqueta peptídica corta;



Fórmula (H-a)

(c) desproteger el grupo 4'-fosfopanteteinilo protegido para dar un grupo 4'-fosfopanteteinilo activado de Fórmula (D-a)



Fórmula (D-a)

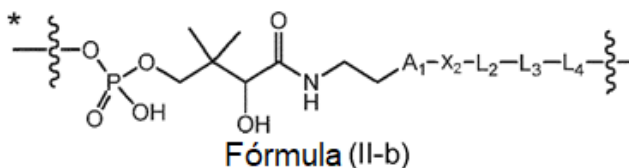
5 y

(d) hacer reaccionar el grupo 4'-fosfopanteteinilo activado con un compuesto de Fórmula (IIa):

X-L₂-L₃-L₄-TG Fórmula (II-a),

donde PG es un grupo protector y X, R₁, R₂, A₁, L₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

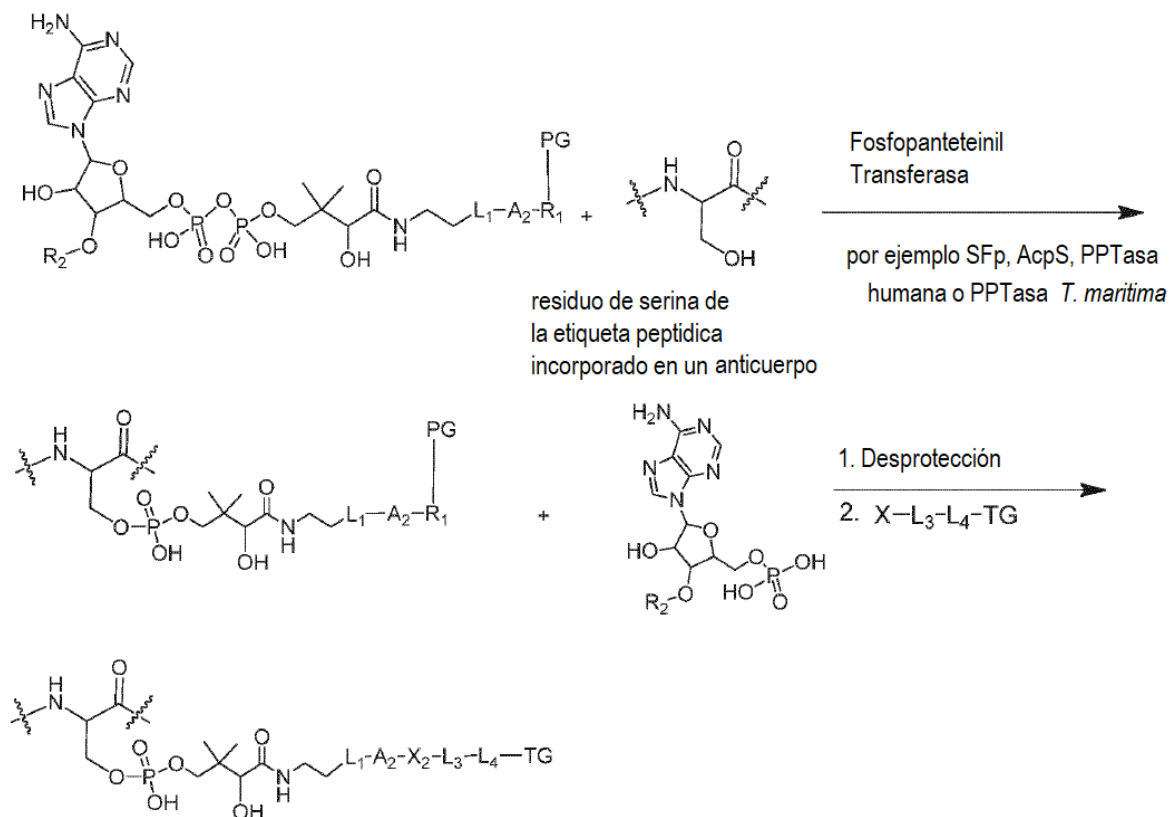
10 Como resultado del método de tres etapas del Esquema (IIIa), el grupo terminal está unido al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la Fórmula (IIb):



Fórmula (II-b)

donde A₁, X₂, L₂, L₃ y L₄ son como se definen en este documento y el * indica que la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo modificada está unida a la etiqueta del péptido pequeño.

Otra realización del método de tres etapas se muestra en el Esquema (IIIb).

Esquema (IIIb)

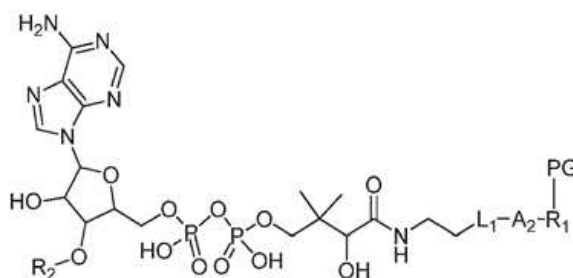
donde PG es un grupo protector y X, R₁, R₂, L₁, A₂, X₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

El método de tres etapas del esquema (IIIb) incluye las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo que ha sido diseñado para contener una etiqueta peptídica corta, y en donde la etiqueta peptídica es un sustrato de una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa;

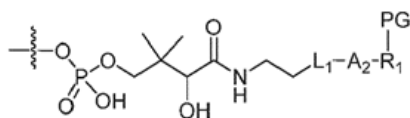
(b) etiquetar el anticuerpo modificado o su fragmento mediante:

incubar el anticuerpo modificado o el fragmento del mismo con una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa en presencia de un compuesto de Fórmula (J),



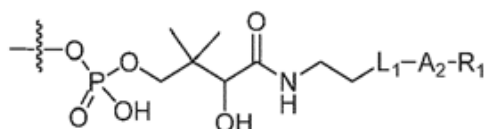
Fórmula (J)

uniendo de este modo un grupo 4'-fosfopanteteinilo protegido de Fórmula (I-a) a la etiqueta peptídica corta;



Fórmula (J-a)

(c) desproteger el grupo 4'-fosfopanteteinilo protegido para dar un grupo 4'-fosfopanteteinilo activado de Fórmula (E-a)



Fórmula (E-a)

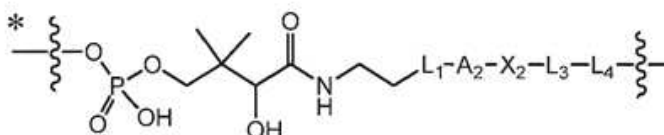
5 y

(d) hacer reaccionar el grupo 4'-fosfopanteteinilo activado con un compuesto de Fórmula (II-c):

X-L₃-L₄-TG Fórmula (II-c),

donde PG es un grupo protector y X, R₁, R₂, L₁, A₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

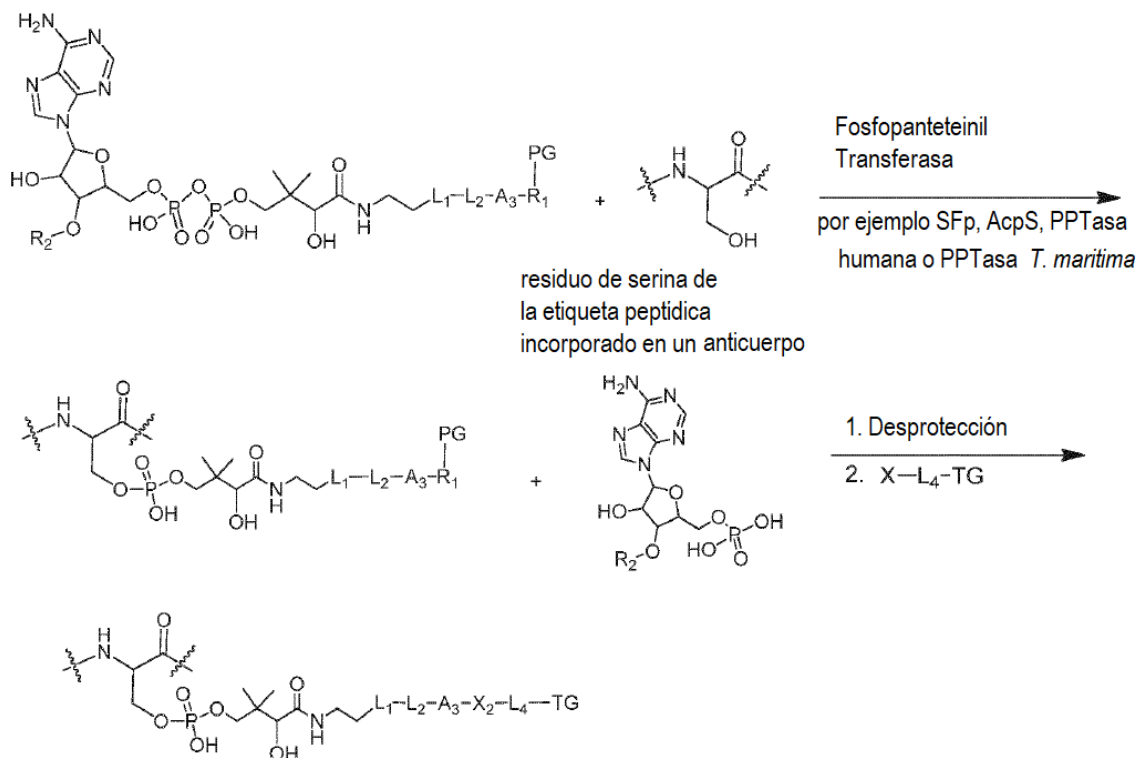
10 Como resultado del método de tres etapas del esquema (IIIb), el grupo terminal se une al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la fórmula (II-d):



Fórmula (II-d)

donde L₁, A₂, X₂, L₃ y L₄ son como se definen en este documento y el * indica que la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo modificada está unida a la etiqueta del péptido pequeño.

Otra realización del método de tres etapas se muestra en el Esquema (IIIc).

Esquema (IIIc)

donde PG es un grupo protector y X, R₁, R₂, L₁, L₂, X₂, A₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

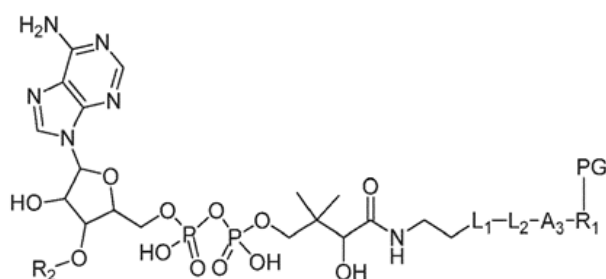
El método de tres etapas del esquema (IIIc) incluye las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo que ha sido diseñado para contener una etiqueta peptídica corta, y en donde la etiqueta peptídica es un sustrato de una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa;

(b) etiquetar el anticuerpo modificado o su fragmento mediante:

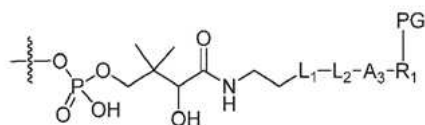
incubar el anticuerpo modificado o un fragmento del mismo con una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa en presencia de un compuesto de Fórmula (K),

10



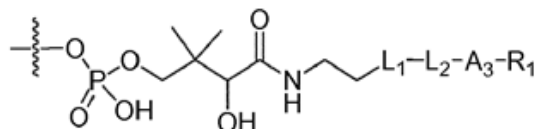
Fórmula (K)

uniendo de este modo un grupo 4'-fosfopanteteinilo protegido de Fórmula (K-a) a la etiqueta peptídica corta;



Fórmula (K-a)

(c) desproteger el grupo 4'-fosfopanteteinilo protegido para dar un grupo 4'-fosfopanteteinilo activado de Fórmula (F-a)



Fórmula (F-a)

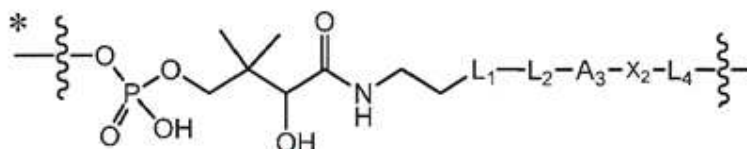
5 y

(d) hacer reaccionar el grupo 4'-fosfopanteteinilo activado con un compuesto de Fórmula (II-e):

X-L₄-TG Fórmula (II-e),

donde PG es un grupo protector y X, R₁, R₂, L₁, L₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

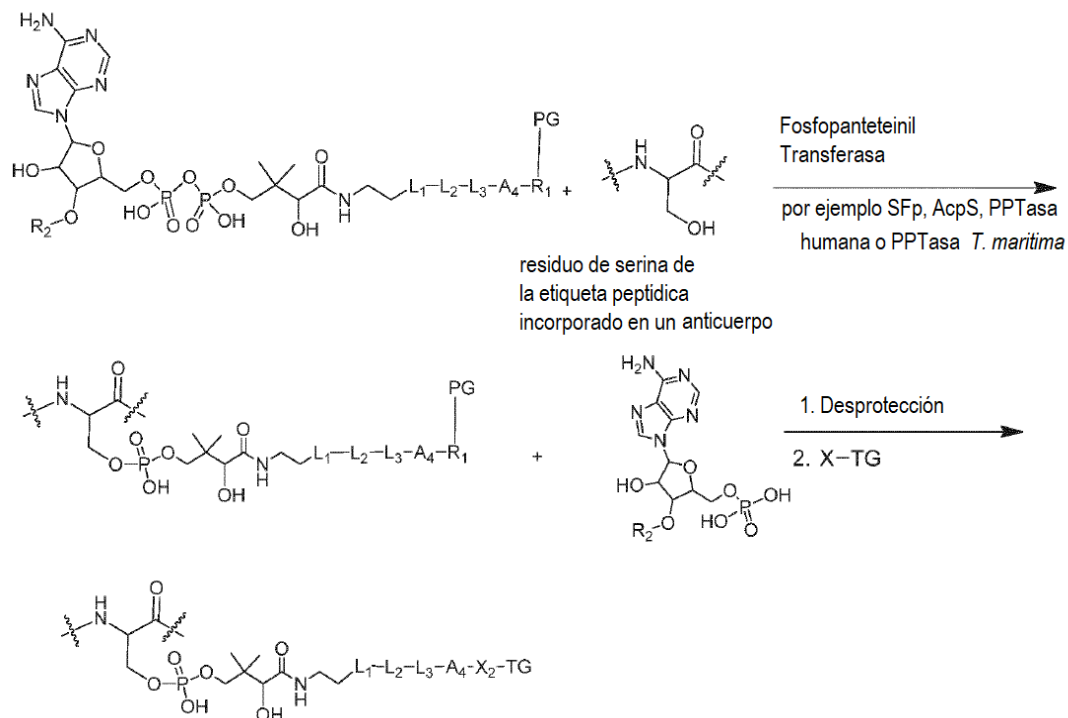
10 Como resultado del método de dos etapas del esquema (IIIc), el grupo terminal se une al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la fórmula (II-f):



Fórmula (II-f)

donde L₁, L₂, A₃, X₂ y L₄ son como se definen en este documento y el * indica que la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo modificada está unida a la etiqueta del péptido pequeño.

Otra realización del método de tres etapas se muestra en el Esquema (IIId).

Esquema (IIIId)

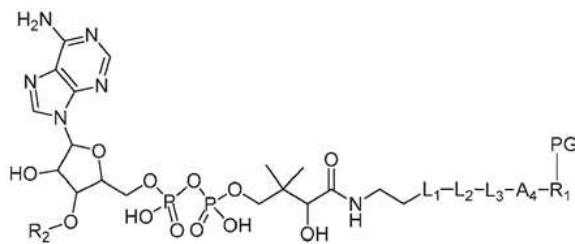
donde PG es un grupo protector y X, R₁, R₂, L₁, L₂, L₃, A₄, X₂ y TG son como se definen aquí.

El método de tres etapas del esquema (IIIId) incluye las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo que ha sido diseñado para contener una etiqueta peptídica corta, y en donde la etiqueta peptídica es un sustrato de una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa;

(b) etiquetar el anticuerpo modificado o su fragmento mediante:

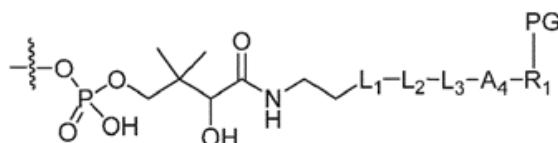
incubar el anticuerpo modificado o el fragmento del mismo con una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa en presencia de un compuesto de Fórmula (L),



Fórmula (L)

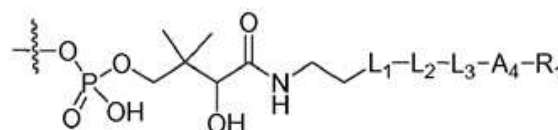
10

uniendo de este modo un 4'-fosfopanteteinil activado de Fórmula (L-a) a la etiqueta peptídica corta;



Fórmula (L-a)

(c) desproteger el grupo 4'-fosfopanteteinilo protegido para dar un grupo 4'-fosfopanteteinilo activado de Fórmula (G-a)



Fórmula (G-a)

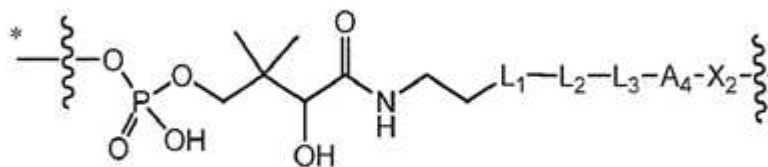
5 y

(d) hacer reaccionar el grupo 4'-fosfopanteteinilo activado con un compuesto de Fórmula (II-g):

X-TG Fórmula (II-g),

donde PG es un grupo protector X, R₁, R₂, L₁, L₂, L₃, L₄ y TG son como se definen aquí.

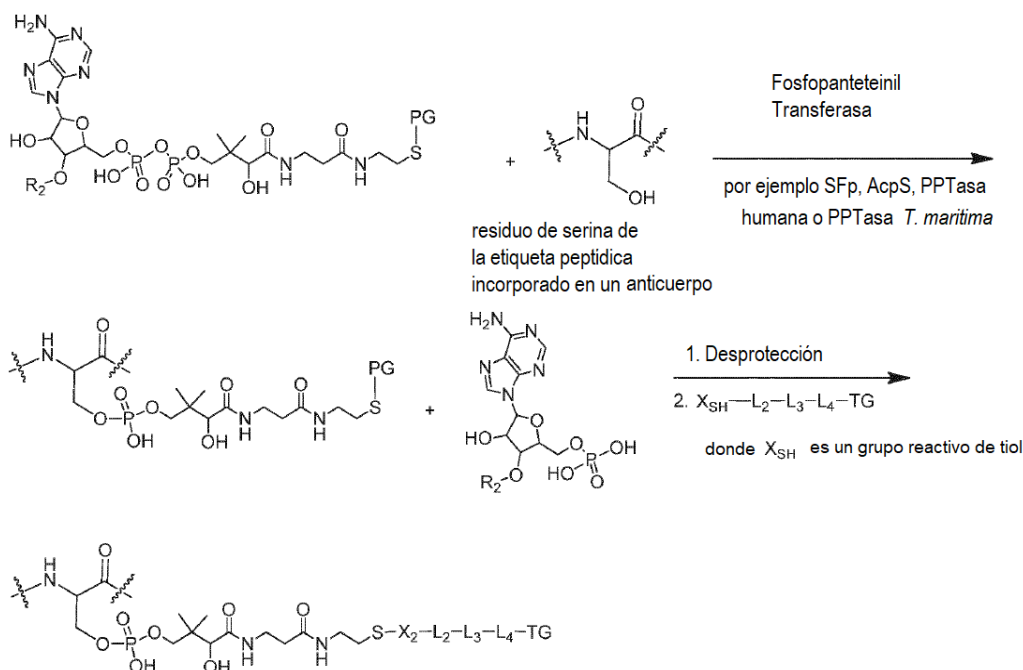
10 Como resultado del método de tres etapas del esquema (IIId), el grupo terminal se une al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la fórmula (II-h):



Fórmula (II-h)

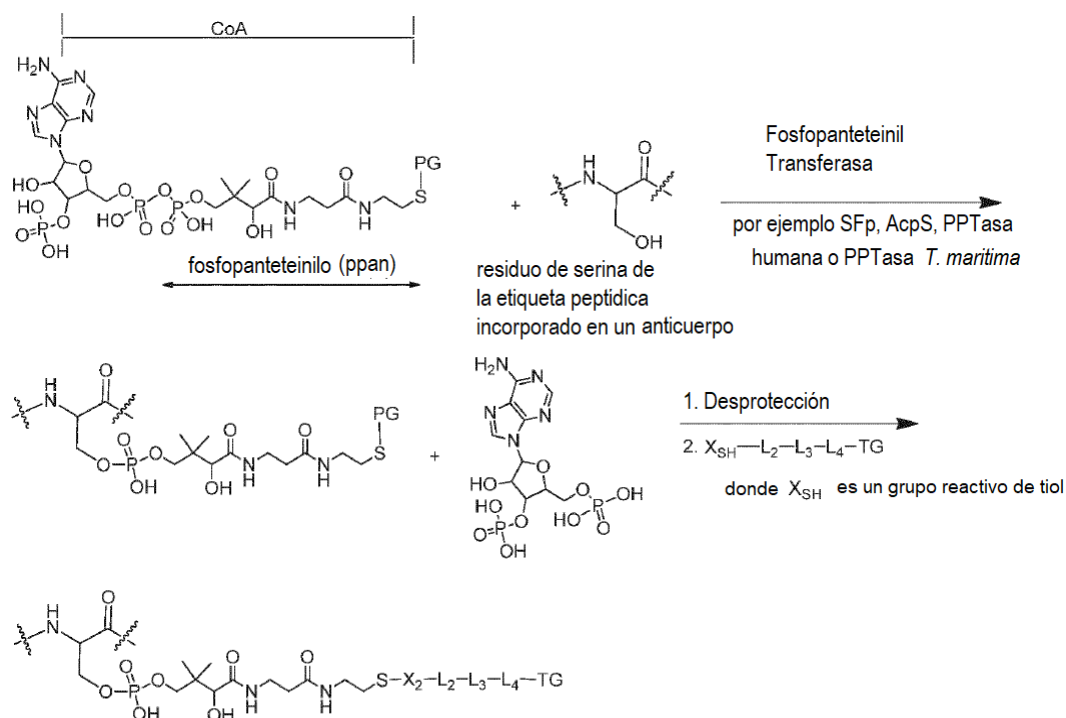
donde L₁, L₂, L₃, A₄ y X₂ son como se definen en este documento y el * indica que la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo modificada está unida a la etiqueta del péptido pequeño.

15 El Esquema (IIle) muestra una cierta realización del método de tres etapas en donde los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos proporcionados en este documento están específicamente marcados en el sitio por un análogo de CoA en donde el tiol del grupo protésico 4'-fosfopanteteinilo está protegido. En el paso 1, el análogo de CoA protegido reacciona con la serina conservada de la etiqueta peptídica corta diseñada en el anticuerpo uniendo así el grupo protésico que contiene el tiol protegido a la etiqueta peptídica corta a través de la formación de un enlace fosfodiéster con el grupo hidroxilo del residuo de serina conservada de la etiqueta peptídica corta. En la segunda etapa, el grupo protector de tiol se elimina y el anticuerpo modificado resultante o fragmento del mismo que tiene un grupo 4'-fosfopanteteinilo pendiente se hace reaccionar con un grupo reactivo de tiol unido a un grupo terminal (TG).

Esquema (IIIe)

donde X_{SH} , grupo protector (PG), R_2 , A_2 , L_3 , L_4 y TG son como se definen aquí.

El Esquema (IIIe) muestra una cierta realización del método de tres etapas en donde los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos proporcionados en este documento se marcan específicamente en el sitio usando un CoA donde el grupo protésico 4'-fosfopantenetino está protegido. En el paso 1, la CoA protegida reacciona con la serina conservada de la etiqueta peptídica corta diseñada en el anticuerpo uniéndose así el grupo protésico que contiene el tiol protegido a la etiqueta peptídica corta a través de la formación de un enlace fosfodiéster con el grupo hidroxilo del residuo de serina conservada de la etiqueta del péptido corto. En la segunda etapa, el grupo protector de tiol se elimina y el anticuerpo modificado resultante o fragmento del mismo que tiene un grupo 4'-fosfopanteteinilo pendiente se hace reaccionar con un grupo reactivo de tiol unido a un grupo terminal (TG).

Esquema (III f)

donde X_{SH} , grupo protector (PG), R_2 , A_2 , L_3 , L_4 y TG son como se definen aquí.

En el método de tres etapas del Esquema (IIIe) y del Esquema (III f), el grupo protector de tiol incluye, pero no se limita a, acetilo, acetamidometilo, bencilo, 4-metilbencilo, 4-metoxibencilo, tritilo, metoxitrilo, t-butilo, t-butiltiol y 3-nitro-2-piridinesulfenilo. El grupo reactivo de tiol del Esquema (IIIe) y el Esquema (III f) incluye, pero no se limita a, maleimida, un haloacetilo, una haloacetamida, un piridildisulfuro y una vinil sulfona.

El método de tres etapas del esquema (III f) incluye las etapas de:

(a) proporcionar un anticuerpo modificado o un fragmento del mismo que ha sido diseñado para contener una etiqueta peptídica corta, y en donde la etiqueta peptídica es un sustrato de una enzima que tiene actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa;

(b) etiquetar el anticuerpo modificado o su fragmento mediante:

(i) incubar el anticuerpo modificado o un fragmento del mismo con una enzima que tenga actividad 4'-fosfopanteteinil-transferasa en presencia de una coenzima A protegida con tiol, uniendo así el grupo protésico protegido con tiol de la coenzima A a la etiqueta del péptido corto;

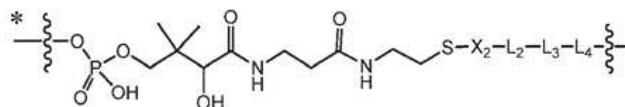
(ii) desproteger el grupo tiol formando de este modo un grupo 4'-fosfopantoetano que tiene un tiol pendiente,

y

(iii) hacer reaccionar el tiol pendiente del grupo 4'-fosfopanteteinilo con un compuesto de Fórmula (III f):

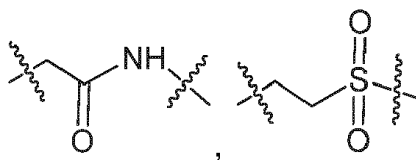
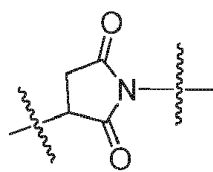
$X_{SH}-L_2-L_3-L_4-TG$ Fórmula (III f).

donde X_{SH} es un grupo reactivo con tiol que incluye, pero no se limita a, una maleimida, un haloacetilo, una haloacetamida, un piridildisulfuro y una vinil sulfona. A_2 , L_3 , L_4 y TG son como se definen aquí. Además, en el método de dos etapas del Esquema (III f), el grupo terminal está unido al anticuerpo modificado o fragmento del mismo a través de un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la Fórmula (III-a):



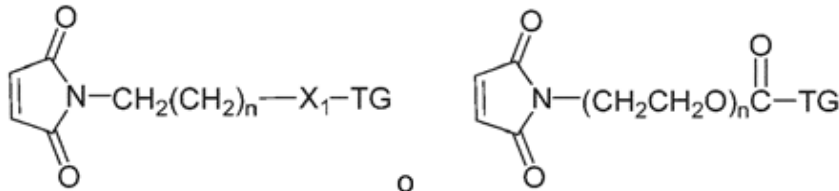
Fórmula (III-a)

El * indica que la unidad estructural 4'-fosfopanteteenilo está unido a la etiqueta del pequeño péptido y L₂, L₃, L₄ y TG son como se definen en este documento. En esta realización, X₂ es un grupo formado por reacción de X_{SH} y el tiol pendiente, que incluye, entre otros,

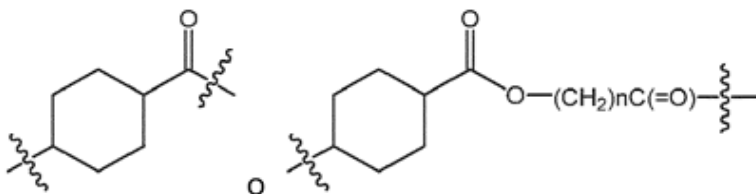


y -S-S-.

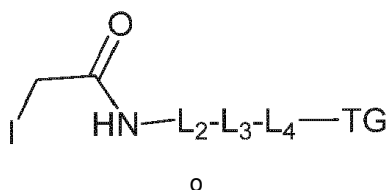
En ciertas realizaciones, X_{SH}-L₂-L₃-L₄-TG es en donde:

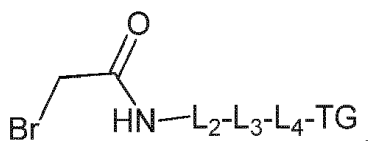


10 X₁ es un enlace, -C(=O)-, -NH-, -NHC(=O)-, -(C(=O)NH(CH₂)_n)_m-,



En otras realizaciones, X_{SH}-L₂-L₃-L₄-TG es





En ciertas realizaciones de los métodos de tres etapas descritos en el presente documento, el anticuerpo modificado o el fragmento del mismo se pone en contacto con un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (H), Fórmula (J), Fórmula (K) o Fórmula (L) y la enzima 4'-fosfopanteteinil transferasa que se coexpresa en la misma célula que el anticuerpo modificado expresado o su fragmento. En ciertas realizaciones de los métodos de dos etapas descritos en el presente documento, el anticuerpo modificado o fragmento del mismo se pone en contacto en el medio de cultivo celular con un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (H), Fórmula (J), Fórmula (K) o Fórmula (L) y la enzima 4'-fosfopanteteinil transferasa coexpresada por la misma u otra célula. En ciertas realizaciones de los métodos de dos etapas descritos en el presente documento, la enzima 4'-fosfopanteteinil-transferasa se inmoviliza sobre un soporte sólido. En ciertas realizaciones, el soporte sólido está compuesto opcionalmente de un polímero sobre una perla o una columna.

En ciertas realizaciones del método de tres etapas, el anticuerpo modificado o fragmento del mismo se pondrá en contacto con una enzima 4'-fosfopanteteinil-transferasa que se coexpresa en la misma célula. En ciertas realizaciones del método de tres etapas, la coenzima A protegida con tiol es acetil-coenzima A. En ciertas realizaciones del método de tres etapas, el anticuerpo modificado o fragmento del mismo se pone en contacto en el medio de cultivo celular con la coenzima A protegida con tiol y una enzima 4'-fosfopanteteinil transferasa coexpresada por la misma u otra célula. En ciertas realizaciones del método de tres etapas, la enzima 4'-fosfopanteteinil transferasa se inmoviliza sobre un soporte sólido. El soporte sólido está compuesto opcionalmente de un polímero sobre una perla o una columna.

En ciertas realizaciones del método de una etapa, los métodos de dos etapas o los métodos de tres etapas descritos en este documento, el anticuerpo modificado o su fragmento se pone en contacto, dependiendo del método utilizado, con un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (A), Fórmula (B), Fórmula (C), Fórmula (D), Fórmula (E), Fórmula (F), Fórmula (G), Fórmula (H), Fórmula (J), Fórmula (K) o Fórmula (L) y una enzima 4'-fosfopanteteinil transferasa a temperaturas entre 0 y 37 grados Celsius en un regulador o medio ajustado a valores de pH entre 3 y 10, preferiblemente entre 7 y 9 y más preferiblemente alrededor de 8, para tiempos de reacción entre 5 minutos y 48 horas.

En ciertas realizaciones del método de una etapa, los métodos de dos etapas o los métodos de tres etapas descritos en este documento, el anticuerpo modificado o su fragmento se pone en contacto, dependiendo del método utilizado, con un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (A), Fórmula (B), Fórmula (C), Fórmula (D), Fórmula (E), Fórmula (F), Fórmula (G), fórmula (H), Fórmula (J), Fórmula (K) o Fórmula (L) en presencia de 4'-fosfopanteteinil transferasa en solución. En otras realizaciones del método de una etapa, los métodos de dos etapas o los métodos de tres etapas descritos en el presente documento, el anticuerpo modificado o su fragmento se pone en contacto, dependiendo del método utilizado, con un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (A), Fórmula (B), Fórmula (C), Fórmula (D), Fórmula (E), Fórmula (F), Fórmula (G), Fórmula (H), Fórmula (J), Fórmula (K) o Fórmula (L) en la presencia de 4'-fosfopanteteinil transferasa en medios celulares. En ciertas realizaciones del método de una etapa, los métodos de dos etapas o los métodos de tres etapas descritos en el presente documento, el anticuerpo modificado o su fragmento se pone en contacto, dependiendo del método utilizado, con un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (A), Fórmula (B), Fórmula (C), Fórmula (D), Fórmula (E), Fórmula (F), Fórmula (G), Fórmula (H), Fórmula (J), Fórmula (K) o Fórmula (L) en la presencia de 4'-fosfopanteteinil transferasa dentro de una célula.

En ciertas realizaciones del método de una etapa, los métodos de dos etapas o los métodos de tres etapas descritos en el presente documento, el anticuerpo modificado o su fragmento se pone en contacto, dependiendo del método utilizado, con un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (A), Fórmula (B), Fórmula (C), Fórmula (D), Fórmula (E), Fórmula (F), Fórmula (G), Fórmula (H), Fórmula (J), Fórmula (K) o Fórmula (L) en la presencia de 4'-fosfopanteteinil-transferasa, en la que la 4'-fosfopanteteinil-transferasa se inmoviliza sobre una superficie. En ciertas realizaciones, la superficie es una perla de polímero.

En ciertas realizaciones del método de una etapa, los métodos de dos etapas o los métodos de tres etapas descritos en el presente documento, el anticuerpo modificado o su fragmento se pone en contacto, dependiendo del método utilizado, con un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (A), Fórmula (B), Fórmula (C), Fórmula (D), Fórmula (E), Fórmula (F), Fórmula (G), Fórmula (H), Fórmula (J), Fórmula (K) o Fórmula (L) en presencia de 4'-fosfopanteteinil transferasa, en la que el anticuerpo modificado o fragmento del mismo se inmoviliza sobre una superficie. En ciertas realizaciones, la superficie es una perla de polímero.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo modificado o el fragmento del mismo proporcionado en el presente documento están marcados con una relación de grupo terminal ("TG") a anticuerpo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en donde el anticuerpo modificado o el fragmento del mismo contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 etiquetas peptídicas cortas ubicadas en el bucle estructural del anticuerpo y donde las etiquetas peptídicas cortas son sustratos de Sfp 4'-fosfopanteteinil-transferasa, AcpS 4'-fosfopanteteinil transferasa, T. maritima 4'-fosfopanteteinil transferasa, C. thermocellum 4'-fosfopanteteinil transferasa, 4'-fosfopanteteinil transferasa humana, o una forma mutante de los mismos. Por ejemplo, se logra una

relación de TG a anticuerpo de 4 mediante la conjugación del grupo terminal con cuatro copias de etiquetas S6 insertadas, o con cuatro copias de etiquetas ybbR insertadas o con cuatro copias de etiquetas A1 insertadas, o con una combinación de dos copias de las etiquetas S6 insertadas y dos copias de las etiquetas ybbR insertadas. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento modificado del mismo proporcionado en el presente documento se marca con dos grupos terminales diferentes que utilizan dos etiquetas peptídicas diferentes y dos 4'-fosfopanteteinil-transferasas diferentes. A modo de ejemplo, dos copias de la etiqueta A1 se conjugan a un primer grupo terminal utilizando la AcpS 4'-fosfopanteteinil-transferasa. Luego, un segundo grupo terminal se une a dos copias de una etiqueta S6 utilizando la Sfp 4'-fosfopanteteinil transferasa (véase, por ejemplo, Zhou et al., ACS Chem. Biol. 2: 337-346, 2007).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos proporcionados en el presente documento están marcados con una relación de grupo terminal (TG) a anticuerpo (por ejemplo, DAR) de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en donde el anticuerpo modificado o el fragmento del mismo contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 etiquetas peptídicas cortas ubicadas en el bucle estructural del anticuerpo y donde las etiquetas peptídicas cortas son sustratos de Sfp 4'-fosfopanteteinil transferasa, AcpS 4'-fosfopanteteinil transferasa, T. maritima 4'-fosfopanteteinil transferasa, C. thermocellum 4'-fosfopanteteinil transferasa, 4'-fosfopanteteinil transferasa humana, o una forma mutante de los mismos. Por ejemplo, se alcanza una relación de TG a anticuerpo de 4 conjugando un grupo farmacológico con cuatro copias de las etiquetas S6 insertadas, o con cuatro copias de las etiquetas ybbR insertadas, o con cuatro copias de las etiquetas A1 insertadas, o con una combinación de dos copias de las etiquetas S6 insertadas y dos copias de las etiquetas ybbR insertadas. En ciertas realizaciones, los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos proporcionados en el presente documento están marcados con dos unidades estructurales de fármaco diferentes utilizando dos etiquetas peptídicas diferentes y dos 4'-fosfopanteteinil-transferasas diferentes. A modo de ejemplo, dos copias de la etiqueta A1 se conjugan a una primera unidad estructural de fármaco usando la AcpS 4'-fosfopanteteinil-transferasa. Luego, una segunda unidad estructural de fármaco se une a dos copias de una etiqueta S6 utilizando la Sfp 4'-fosfopanteteinil transferasa (véase, por ejemplo, Zhou et al., ACS Chem. Biol. 2: 337-346, 2007).

3. Alteración adicional del marco de la región Fc

La presente invención proporciona inmunoconjugados marcados específicos de sitio. Los inmunoconjugados de la invención pueden comprender anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos que comprenden además modificaciones a residuos estructurales dentro de V_H y/o V_L, por ejemplo para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales modificaciones al marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más residuos del marco a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Dichos residuos pueden identificarse comparando las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las que se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "retromutadas" a la secuencia de línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida. Dichos anticuerpos "retromutados" también están destinados a ser abarcados por la invención.

Otro tipo de modificación de marco implica mutar uno o más residuos dentro de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epítopos de células T para reducir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Esta metodología también se conoce como "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de Patente Estadounidense No. 20030153043 de Carr et al.

Además o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro del marco o las regiones CDR, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, como la vida media en suero, fijación del complemento, unión al receptor Fc y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, una o más unidades estructurales químicas pueden unirse al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas modificaciones se describe con más detalle a continuación.

En una modificación, la región de bisagra de CH1 se modifica de tal manera que se altera el número de residuos de cisteína en la región de bisagra, por ejemplo, aumenta o disminuye. Esta metodología se describe con más detalle en la Patente de los Estados Unidos No. 5,677,425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra modificación, la región bisagra de Fc de un anticuerpo se hace mutar para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones de aminoácidos se introducen en la región de la interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra, de modo que el anticuerpo tiene un deterioro en la unión de la proteína A de estafilococo (SpA) en relación con la unión de SpA del dominio de la bisagra Fc nativa. Esta metodología se describe con más detalle en la Patente de los Estados Unidos No. 6,165,745 de Ward et al.

En otras modificaciones, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo de aminoácido con una unidad estructural de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más

aminoácidos pueden reemplazarse con una unidad estructural de aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. El ligando efector al que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Esta metodología se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,624,821 y 5,648,260, ambas de Winter et al.

En otra modificación, uno o más aminoácidos seleccionados de residuos de aminoácidos pueden reemplazarse con una unidad estructural de aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo haya alterado la unión de C1q y/o reduzca o elimine la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Esta metodología se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos No. 6,194,551 de Idusogie et al.

En otra modificación, uno o más residuos de aminoácidos se alteran para alterar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Esta metodología se describe, por ejemplo, en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al. En una realización específica, uno o más aminoácidos de un anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención se reemplazan por uno o más residuos de aminoácidos alotípicos, tales como los mostrados en la Figura 4 para la subclase IgG1 y el isotipo kappa. Los residuos de aminoácidos alotípicos también incluyen, pero no se limitan a, la región constante de la cadena pesada de las subclases de IgG1, IgG2 e IgG3, así como la región constante de la cadena ligera del isotipo kappa como lo describen Jefferis et al., *Mab. 1*: 332-338 (2009).

En otra modificación más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fcγ modificando uno o más aminoácidos. Esta metodología se describe, por ejemplo, en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604, 2001).

En otra modificación más, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el "antígeno". Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de marco de región variable para eliminar así la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal metodología se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,714,350 y 6,350,861 de Co et al.

Adicional o alternativamente, se puede producir un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNac bisectadas aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de anticuerpos de ADCC. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y pueden usarse como células hospedadoras en las cuales expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir así un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1,176,195 de Hang et al. describe una línea celular con un gen FUT8 alterado funcionalmente, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea celular CHO variante, las células Lec3, con capacidad reducida para unir la fucosa a los carbohidratos ligados a Asn (297), lo que también resulta en la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740). La Publicación PCT WO 99/54342 por Umana et al. describe líneas celulares diseñadas para expresar las glucosil transferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas exhiben un aumento de las estructuras de GlcNac bisectantes, lo que resulta en una mayor actividad ADCC de anticuerpos (véase también Umana et al., *Nat. Biotech.* 17: 176-180, 1999).

En otra modificación, el anticuerpo se modifica para aumentar su vida media biológica. Son posibles diversas metodologías. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,277,375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o C_L para contener un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,869,046 y 6,121,022 de Presta et al.

4. Conjugados de anticuerpos

La presente invención proporciona métodos de marcación específicos para el sitio, anticuerpos modificados y fragmentos de los mismos, e inmunoconjugados preparados en consecuencia. Usando los métodos de la invención, un anticuerpo modificado o fragmentos del mismo pueden conjugarse con una etiqueta, tal como una unidad estructural de fármaco, por ejemplo, un agente anticanceroso, un agente de tratamiento autoinmune, un agente antiinflamatorio, un agente antifúngico, un agente antibacteriano, un agente antiparasitario, un agente antiviral o un agente anestésico. También se pueden conjugar un anticuerpo o fragmentos del mismo usando varias unidades

estructurales de marcación idénticas o diferentes que combinan los métodos de la invención con otros métodos de conjugación.

En ciertas realizaciones, el grupo terminal de los inmunoconjugados de la presente invención se selecciona entre un inhibidor de V-ATPasa, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTor, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, y dolastatina, un maitansinoide, una MetAP (metionina aminopeptidasa), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de la DPPIV, inhibidores del proteasoma, inhibidores de las reacciones de transferencia de fosforilo en la mitocondria, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de la quinasa, un inhibidor de la CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor de Eg5, un inhibidor de HDAC, un inhibidor de ARN polimerasa, un agente dañino de ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalador de ADN, un ligante de surco de ADN y un inhibidor de DHFR.

Además, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados de la presente invención pueden conjugarse con una unidad estructural terapéutica o unidad estructural de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Las unidades estructurales terapéuticas o las unidades estructurales de fármacos no deben considerarse limitados a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la unidad estructural de fármaco puede ser una proteína, péptido o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina como abrina, ricina A, pseudomonas exotoxina, toxina del cólera o toxina de la difteria, una proteína como el factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, una citoquina, un agente apoptótico, un agente antiangiogénico o un modificador de respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfoquina.

En una realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados de la presente invención se conjugan con una unidad estructural terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Ejemplos de citotoxinas incluyen, pero no se limitan a, taxanos (véanse, por ejemplo, las Solicitudes de Patente Internacional (PCT) números WO 01/38318 y WO 03/097625), agentes alquilantes de ADN (por ejemplo, análogos de CC-1065), antraciclinas, análogos de tubulicina, análogos de duocarmicina, auristatina E, auristatina F, maitansinoides y agentes citotóxicos que comprenden una unidad estructural de polietilenglicol reactivo (véase, por ejemplo, Sasse et al., *J. Antibiot. (Tokio)*, 53, 879-85 (2000), Suzawa et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 2175-84 (2000), Ichimura et al., *J. Antibiot. (Tokyo)*, 44, 1045-53 (1991), Francisco et al., *Blood* (2003) (publicación electrónica antes de la publicación impresa), Patentes Estadounidenses Nos. 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738 y 6,436,931, Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 2001/0036923 A1, Patentes Estadounidenses Nos. 6,716,821 y 6,756,397 y Solicitud de Patente Internacional (PCT) No. WO 01/49698), taxón, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, T. colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiانترacina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos y homólogos de la misma. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes de ablación (por ejemplo, mecloretamina, tioepa cloranbucilo, meifalan, carmustina) (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina) (AMC)), agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). (Véase, por ejemplo, Seattle Genetics US20090304721).

Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y sus derivados. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de caliqueamicina está disponible comercialmente (MylotargTM; Wyeth-Ayerst).

Para una discusión más detallada de los tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito et al., (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 199-215; Trail et al., (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 328-337; Payne, (2003) *Cancer Cell* 3: 207-212; Allen, (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2: 750-763; Pastan and Kreitman, (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3: 1089-1091; Senter and Springer, (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53: 247-264.

De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos también pueden conjugarse con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, denominados radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para preparar radioinmunoconjugados se establecen en la técnica. Ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles comercialmente, incluyendo ZevalinTM (DEC Pharmaceuticals) y BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden usar métodos similares para preparar radioinmunoconjugados utilizando los anticuerpos de la invención. En ciertas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede unirse al anticuerpo a través de una molécula enlazadora. Tales moléculas enlazadoras son comúnmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo et al., (1998) *Clin Cancer Res.* 4(10): 2483-90; Peterson et al., (1999) *Bioconjug. Chem.* 10(4): 553-7; y Zimmerman et al., (1999) *Nucl. Medicina. Biol.* 26(8): 943-50.

La presente divulgación se refiere además a anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un antígeno conjugado a una proteína o polipéptido heterólogo (o fragmento del mismo, preferiblemente a un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En particular, la divulgación se refiere a proteínas de fusión que comprenden un fragmento de anticuerpo descrito aquí (por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento F(ab)₂, un dominio V_H, una CDR V_H, un dominio V_L o una CDR V_L) y una proteína, polipéptido o péptido heterólogo.

Se pueden generar proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de mezcla de genes, mezcla de motivos, combinación de exones y/o combinación de codones (colectivamente denominada "mezcla de ADN"). La mezcla de ADN puede emplearse para alterar las actividades de los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos con afinidades más altas y tasas de disociación más bajas). Véanse, en general, las Patentes de los Estados Unidos No. 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252 y 5,837,458; Patten et al., (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8: 724-33; Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16(2): 76-82; Hansson et al., (1999) J. Mol. Biol. 287: 265-76; y Lorenzo and Blasco, (1998) Biotechniques 24(2): 308-313. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos, o los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos, pueden alterarse sometiéndose a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción de nucleótidos aleatorios u otros métodos antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un antígeno puede recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

Además, los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos de la presente invención pueden conjugarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexa-histidina (SEQ ID NO: 1106), tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz et al., (1989) Proc. Natl Acad Sci. USA 86: 821-824, por ejemplo, hexa-histidina (SEQ ID NO: 1106) proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza (Wilson et al., (1984) Cell 37: 767), y la etiqueta "FLAG" (A. Einhauser et al., J. Biochem. Biophys. Methods 49: 455-465, 2001). De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos también pueden conjugarse con péptidos que penetran en el tumor para mejorar su eficacia.

En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados de la presente invención se conjugan con un agente de diagnóstico o detectable. Dichos inmunoconjugados pueden ser útiles para monitorear o pronosticar el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de prueba clínica, como la determinación de la eficacia de una terapia particular. Dicha diagnosis y detección se pueden realizar al acoplar el anticuerpo a sustancias detectables que incluyen, pero no se limitan a, varias enzimas, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa o la acetilcolinesterasa; grupos protésicos, tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no limitado a, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568 Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 610; Alexa Fluor 633; Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 660; Alexa Fluor 680; Alexa Fluor 700; Alexa Fluor 750; umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos, tales como, pero no limitándose a, yodo (¹³¹I, ¹²⁵I y ¹²³I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In y ¹¹¹In), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ⁶⁴Cu, ¹¹³Sn y ¹¹⁷Sn; y metales emisores de positrones que se utilizan en diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados de la invención también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliácridamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

5. Composición farmacéutica

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyen inmunoconjugados, los inmunoconjugados de la invención se mezclan con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener además uno o más agentes terapéuticos adecuados para tratar o prevenir el cáncer (cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas, tumores de la vaina del nervio periférico, schwannoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de esófago de Barretts, glioblastoma, sarcoma de células claras de tejido blando, mesotelioma maligno, neurofibromatosis, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna (BPH), ginecomastia, y endometriosis).

Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico pueden prepararse mezclando con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones, soluciones, lociones o suspensiones acuosas (véase, por ejemplo, Hardman et al., Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, New York, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000; Avis, et al. (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, et al. (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, et al. (eds.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner and Kotkoskie, *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000).

La selección de un régimen de administración para un tratamiento terapéutico depende de varios factores, entre ellos, la rata de recambio de suero o tejido de la entidad, el nivel de los síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. En ciertas realizaciones, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente de acuerdo con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de agente biológico administrado depende en parte de la entidad particular y la gravedad de la condición que se está tratando. Se dispone de orientación para seleccionar las dosis adecuadas de anticuerpos, citoquinas y moléculas pequeñas (véase, por ejemplo, Wawrzynczak, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido, 1996; Kresina (ed.), *Monoclonal Anticuerpos, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y., 1991; Bach (ed.), *Monoclonal Anticuerpos and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y., 1993; Baert et al., *New Engl. J. Med.* 348: 601-608, 2003; Milgrom et al., *New Engl. J. Med.* 341: 1966-1973, 1999; Slamon et al., *New Engl. J. Med.* 344: 783-792, 2001; Beniaminovitz et al. *New Engl. J. Med.* 342: 613-619, 2000; Ghosh et al., *New Engl. J. Med.* 348: 24-32, 2003; Lipsky et al., *New Engl. J. Med.* 343: 1594-1602, 2000).

La determinación de la dosis apropiada es realizada por el médico, por ejemplo, utilizando parámetros o factores conocidos o sospechados en la técnica para afectar el tratamiento o predecir que afectará el tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y se incrementa en pequeños incrementos a partir de ese momento hasta que se logre el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo. Las medidas diagnósticas importantes incluyen las de los síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citoquinas inflamatorias producidas.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción de el compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico anterior del paciente que se está tratando, y factores similares conocidos en las artes médicas.

Las composiciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención pueden proporcionarse mediante infusión continua, o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana o 1-7 veces por semana. Las dosis pueden administrarse por vía intravenosa, subcutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral o por inhalación. Un protocolo de dosis específica es uno que involucra la dosis máxima o la frecuencia de la dosis que evita los efectos secundarios significativos no deseados.

Para los inmunoconjugados de la invención, la dosis administrada a un paciente puede ser de 0.0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis puede estar entre 0.0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0.0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0.0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0.0001 y 2 mg/kg, 0.0001 y 1 mg/kg, 0.0001 mg/kg y 0.75 mg/kg, 0.0001 mg/kg y 0.5 mg/kg, 0.0001 mg/kg a 0.25 mg/kg, 0.0001 a 0.15 mg/kg, 0.0001 a 0.10 mg/kg, 0.001 a 0.5 mg/kg, 0.01 a 0.25 mg/kg o 0.01 a 0.10 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se puede calcular utilizando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis por administrar en mg/kg.

Las dosis de los inmunoconjugados de la invención pueden repetirse y las administraciones pueden separarse al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, o al menos 6 meses. En una realización específica, se repiten los inmunoconjugados de la invención cada 3 semanas.

Una cantidad efectiva para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la condición que se trata, la salud general del paciente, la vía del método y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (véase, por ejemplo, Maynard et al., *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996; Dent, *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, Reino Unido, 2001).

La vía de administración puede ser, por ejemplo, por aplicación tópica o cutánea, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebrospinal, intralesional o por sistemas de liberación sostenida o un implante (véase, por ejemplo, Sidman et al., *Biopolymers* 22: 547-556, 1983; Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277, 1981; Langer, *Chem. Tecnología* 12: 98-105, 1982; Epstein et al.,

Proc. Natl Acad Sci. USA 82: 3688-3692, 1985; Hwang et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 77: 4030-4034, 1980; Patente de los Estados Unidos Nos. 6,350,466 y 6,316,024). Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Además, también se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540 y 4,880,078; y las publicaciones PCT Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903.

Una composición de la presente invención también se puede administrar a través de una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciarán los expertos en la técnica, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las rutas de administración seleccionadas para los inmunoconjugados de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras parenterales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluye, sin limitación, administración intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternón. Alternativamente, una composición de la invención puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica. En una realización, los inmunoconjugados de la invención se administran por infusión. En otra realización, los inmunoconjugados de la invención se administran por vía subcutánea.

Si los inmunoconjugados de la invención se administran en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida, se puede usar una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véase Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref Biomed. Eng. 14:20, 1987; Buchwald et al., Surgery 88: 507, 1980; Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321: 574, 1989). Los materiales poliméricos se pueden usar para lograr la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1983; véase también Levy et al., Science 228:190, 1985; During et al., Ann. Neurol. 25:351, 1989; Howard et al., J. Neurosurg. 7 1:105, 1989; Patente de los Estados Unidos No. 5,679,377; Patente de los Estados Unidos No. 5,916,597; Patente de los Estados Unidos No. 5,912,015; Patente de los Estados Unidos No. 5,989,463; Patente de los Estados Unidos No. 5,128,326; Publicación PCT No. WO 99/15154; y Publicación PCT No. WO 99/20253. Ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, entre otros, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxiethyl), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG) polianhidridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidas) (PLGA) y poliortoésteres. En una realización, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable en el almacenamiento, estéril y biodegradable. Un sistema de liberación controlada o sostenida puede colocarse cerca de la diana profiláctica o terapéutica, por lo que requiere solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pág. 115-138, 1984).

Los sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer, Science 249: 1527-1533, 1990). Se puede usar cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más inmunoconjugados de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,526,938, publicación PCT WO 91/05548, Publicación PCT WO 96/20698, Ning et al., Radiotherapy & Oncology 39: 179-189, 1996; Song et al., PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50: 372-397, 1995; Cleek et al., Pro. Int'l. Simp. Controlar. Rel. Bioactivo Mater. 24: 853-854, 1997; y Lam et al., Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760, 1997.

Si los inmunoconjugados de la invención se administran por vía tópica, pueden formularse en forma de ungüento, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, aspersión, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en la materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosificación tópicas no pulverizables, se emplean típicamente formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica, en algunos casos mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, bálsamos y similares, que, si se desea, se esterilizan o mezclan con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, reguladores, o sales) para influir en varias propiedades, como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en las que el ingrediente activo, en algunos casos, en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un producto volátil presurizado (por ejemplo, un propelente gaseoso, como freón) o en una botella exprimible. Si se desea, también se pueden agregar humidificantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si las composiciones que comprenden los inmunoconjugados se administran por vía intranasal, se pueden formular en forma de aerosol, aspersión, niebla o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para el uso de acuerdo con la presente invención se pueden administrar convenientemente en forma de una presentación en aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos (compuestos, por ejemplo, de gelatina) para usar en un inhalador o insuflador pueden formularse con una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, como lactosa o almidón.

Los métodos para la administración conjunta o el tratamiento con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, una citoquina, un esteroide, un agente quimioterapéutico, un antibiótico o una radiación, son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hardman et al., (Eds.) (2001) Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª edición, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.). Una cantidad efectiva de terapia puede disminuir los síntomas en al menos un 10%; en al menos un 20%; al menos alrededor del 30%; al menos el 40%, o al menos el 50%.

Las terapias adicionales (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos), que pueden administrarse en combinación con los inmunoconjugados de la invención, pueden administrarse con menos de 5 minutos, con menos de 30 minutos, con 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, con un intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas, con un intervalo de aproximadamente de 2 horas a aproximadamente 3 horas, con un intervalo de aproximadamente de 3 horas a aproximadamente 4 horas, con un intervalo de aproximadamente de 4 horas a aproximadamente 5 horas, con un intervalo de aproximadamente de 5 horas a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, de 12 horas a 18 horas de diferencia, de 18 horas a 24 horas de diferencia, de 24 horas a 36 horas de diferencia, de 36 horas a 48 horas de diferencia, de 48 horas a 52 horas de diferencia, de 52 horas a 60 horas de diferencia, de 60 horas a 72 horas de diferencia, de 72 horas a 84 horas de diferencia, de 84 horas a 96 horas de diferencia, o de 96 horas a 120 horas de diferencia con respecto a los inmunoconjugados de la invención. Las dos o más terapias pueden administrarse dentro de una misma visita del paciente.

En ciertas realizaciones, los inmunoconjugados de la invención pueden formularse para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nos. 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más unidades estructurales que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, mejorando así la administración de fármacos dirigida (véase, por ejemplo, Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685). Las unidades estructurales de orientación de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nº 5,416,016 de Low et al.); manosidas (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); anticuerpos (Bloeman et al., (1995) FEBS Lett. 357: 140; Owais et al., (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); receptor de proteína A tensioactivo (Briscoe et al., (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134); p 120 (Schreier et al., (1994) J. Biol. Chem. 269: 9090); véase también K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4: 273.

La divulgación proporciona protocolos para la administración de una composición farmacéutica que comprende inmunoconjugados de la divulgación solos o en combinación con otras terapias para un sujeto así lo requiere. Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación de la presente descripción pueden administrarse concomitantemente o secuencialmente a un sujeto. La terapia (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación de la presente descripción también se puede administrar cíclicamente. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, seguida de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo y la repetición esta administración secuencial, es decir, el ciclo, para reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias (por ejemplo, agentes) para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias (por ejemplo, agentes) y/o para mejorar, la eficacia de las terapias.

Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación de la invención pueden administrarse a un sujeto concurrentemente.

El término "concurrentemente" no se limita a la administración de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) exactamente al mismo tiempo, sino que significa que una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos se administra a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que los inmunoconjugados pueden actuar junto con la(s) otra(s) terapia(s) para proporcionar un beneficio mayor que si se administraran de otra manera. Por ejemplo, cada terapia puede administrarse a un sujeto al mismo tiempo o

secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos en el tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada terapia puede administrarse a un sujeto por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En diversos aspectos de la divulgación, las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran a un sujeto durante menos de 15 minutos, menos de 30 minutos, con menos de 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, 24 horas de diferencia, 48 horas de diferencia, 72 horas de diferencia o 1 semana de diferencia. En los aspectos de la divulgación, se administran dos o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) en la misma visita del paciente.

Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse a un sujeto por las mismas o diferentes vías de administración.

La invención, que se ha descrito completamente, se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos y reivindicaciones, que son ilustrativos y no pretenden ser adicionalmente limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Diseño de constructos de IgG marcados con péptidos

Inspección visual de la estructura de RMN del modelo de 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) Sfp (ID de PDB: 2GE1, Koglin et al., (2006) Science 312: 273-276) con un sustrato peptídico revela que el residuo reactivo Ser de la etiqueta S6 se inserta profundamente en el sitio activo de la enzima y se coloca cerca del fosfato alfa de la coenzima A. El sustrato peptídico adopta una conformación de bucle de retorcimiento de hélice con el residuo de Ser en la torcedura. Sobre la base de estas observaciones, se seleccionaron varios bucles en la superficie de los anticuerpos IgG. El procedimiento de selección implicó las siguientes etapas. Primero se construyó un modelo de homología de Trastuzumab utilizando el anticuerpo humano IgG1 B12 (ID de PDB: 1HZH, Saphire et al., (2001) Science 293: 1155-1159) como plantilla. A continuación, se seleccionaron los bucles con un contenido significativo de residuos expuestos a disolventes y se transformaron en bucles de etiqueta S6.

Con ese fin, se explotaron diferentes estrategias: injerto de etiqueta peptídica de longitud completa, injerto de etiqueta peptídica truncada e inserciones (tanto truncadas como de longitud completa). Un ejemplo del injerto de una etiqueta ybbR de longitud completa se ejemplifica con el mutante anti-hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A (SEQ ID NO: 102), mientras que el mutante Trastuzumab anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L (SEQ ID NO: 109) constituye un injerto de una etiqueta S6 truncada. Otra variante de la estrategia de injerto se empleó, por ejemplo, en mutante anti-hHER2-HC-S190G-S191D-S192-L193-G194S-T195W-Q196L-T197L-RLLN-Y198 (SEQ ID NO: 113) en donde los residuos S190 y S191 se mutaron a glicina y ácido aspártico, respectivamente, G194 a serina, T195 a triptófano, Q196 y T197 a leucina y se insertó la etiqueta S6 truncada RLLN (SEQ ID NO: 1060) entre L197 e Y198. Alternativamente, se insertaron etiquetas peptídicas truncadas y de longitud completa en los bucles entre los residuos de anticuerpos.

A lo largo de la sección del Ejemplo, los anticuerpos marcados con péptidos se nombran de acuerdo con la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, que contiene la etiqueta peptídica injertada o insertada. Por simplicidad, la cadena pesada o ligera no modificada asociada no se menciona explícitamente. Por ejemplo, anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121) se refiere a una IgG1, que comprende la cadena pesada marcada con el péptido correspondiente y la cadena ligera kappa no modificada asociada anti-hHER2-LC (SEQ ID NO: 1131) con X₅ = Ala y X₆ = Val (consulte la Figura 3). En contraste, los constructos de la cadena pesada de mAb2 marcados con el péptido están asociados con la mAb2-LC de cadena ligera lambda no modificada (SEQ ID NO: 25). Como otro ejemplo, anti-hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79 (SEQ ID NO: 30) se refiere a un anticuerpo IgG1 que contiene una cadena ligera marcada con un péptido que está asociada con la Ig gamma 1 no modificada anti-hHER2-HC (SEQ ID NO: 1130) con X₁ = Lys, X₂ = Glu, X₃ = Met y X₄ = Ala (consulte la Figura 3). En los casos en que la(s) etiqueta(s) peptídica(s) se insertan o se injertan en la región constante de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo, solo se dan las secuencias de la región constante.

En todos los casos, la etiqueta peptídica se mapeó en los bucles seleccionados de tal manera que el residuo de Ser reactivo estaba en o cerca de la punta del bucle para permitir un ajuste más profundo en el sitio activo de la enzima Sfp. A continuación se construyeron los complejos entre la IgG y la enzima Sfp y se examinaron para detectar choques. Aquellos con choques significativos fueron rechazados y los bucles correspondientes fueron excluidos de la selección.

Para insertar sistemáticamente las secuencias de etiquetas S6 e ybbR en los bucles estructurales de las regiones constantes de Trastuzumab IgG1, los sitios de inserción se eligieron tanto por inspección visual de la estructura cristalina del anticuerpo IgG1 B12 humano (ID de PDB: 1HZH) como también calculando el área de la superficie accesible a los solventes utilizando el programa ICM de MolSoft LLC.

5 Ejemplo 2. Producción de constructos de IgG marcados con péptidos

Las cadenas pesadas y ligeras de Trastuzumab IgG1 se expresaron de forma transitoria en células de mamíferos utilizando el vector de expresión pOG bajo el control de un promotor de CMV. Las etiquetas peptídicas para la marcación con 4'-fosfopanteteinil transferasas se incorporaron en Trastuzumab IgG1 en varias posiciones mediante métodos estándar de biología molecular. Todos los cebadores utilizados para la clonación se enumeran en la Tabla 8.

El cultivo celular y la transfección de células HEK293F se realizaron Usando el método PEI como se describió anteriormente (véase, por ejemplo, Erbacher et al., J Gene Med., 1: 210-222 (1999)). En resumen, las células HEK293F se cotransfectaron con ADN plasmídico que codifica las cadenas pesada y ligera de Trastuzumab (isotipo kappa humano). Las células de mamífero se cultivaron en medio de expresión FreeStyle™ 293 a 37°C con 5% de CO₂, y se dividieron en 0.7x10⁶ células/ml un día antes de la transfección. Después de la transfección, las células HEK293F se cultivaron durante cinco días antes de la recolección por centrifugación a 2000 x g durante 30 minutos a 4°C.

El sobrenadante del medio resultante se filtró a través de un filtro de tamaño de poro de 0.22 µm. El filtrado se cargó luego a una rata de flujo de aproximadamente 1 mL/min en una columna de afinidad de proteína A que se equilibró previamente con 20 volúmenes de columna de PBS. Después de lavar la columna con 20 volúmenes de columna de PBS, el anticuerpo se eluyó con 5 volúmenes de columna de acetato de sodio 0.1 M (pH 3.0). El eluido se neutralizó inmediatamente con Tris/HCl 1 M al 10% (v/v) (pH 10). La diálisis en PBS se realizó utilizando casetes de diálisis Slide-a-Lyzer con un corte de peso molecular de 3.5 o 7.0 kDa (Pierce).

La pureza del producto final se evaluó mediante SDS-PAGE. Los rendimientos de proteína se determinaron mediante el método de Bradford o mediante espectroscopía ultravioleta a 280 nm utilizando un espectrofotómetro ND-1000 UV-Vis. Los rendimientos proteicos de IgG de Trastuzumab marcado con péptidos se enumeran en la Tabla 9.

Tabla 8. Secuencias de ADN de los cebadores utilizados para construir las enzimas PPTasa recombinantes y sus mutantes, así como las IgG de Trastuzumab con etiquetas peptídicas insertadas/injertadas (HC, cadena pesada; LC, cadena ligera)

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hH ER2-HC-A118-GDSLWLLRLLN-S119	150	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCACCAAGGGCCCCAGCG	1061
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCAGCCGAGGAGACGGTGACCAG	1062
anti-hH ER2-HC-S119-GDSLWLLRLLN-T120	151	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCAAGGGCCCCAGCGTGTTC	1063
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTAGCCGAGGAGACGGTGAC	1064
anti-hHER2-HC-T120-GDSLWLLRLLN-K121	152	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGGGCCCCAGCGTGTTC	1065
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTGCTAGCCGAGGAGACG	1066
anti-hH ER2-HC-S131-GDSLWLLRLLN-S132	153	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAAGAGCACCAGCGGCG	1067
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGGGCCAGGGGGAA	1068

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hH ER2-HC-S132-GDSLWLLRLLN-K133	154	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGAGCACCAGCGGCGGCA C	1069
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGGGGGCCAGGGG	1070
anti-hHER2-HC-K133-GDSLWLLRLLN-S134	155	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCACCAGCGGCGGCACAG	1071
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCTGCTGGGGGCCAGG	1072
anti-hHER2-HC-S134-GDSLWLLRLLN-T135	156	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCAGCGGCGGCACAGCC	1073
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCTTGCTGCTGGGGGCC	1074
anti-hHER2-HC-T135-GDSLWLLRLLN-S136	157	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGGCGGCACAGCCGCC	1075
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTGCTCTTGCTGCTGGGG G	1076
anti-hHER2-HC-S136-GDSLWLLRLLN-G137	158	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCGGCACAGCCGCCCTG	1077
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGTGCTCTTGCTGCTG GG	1078
anti-hHER2-HC-G137-GDSLWLLRLLN-G138	159	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCACAGCCGCCCTGGGC	1079
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCGCTGGTGCTCTTGCTG C	1080
anti-hH ER2-HC-G138-GDSLWLLRLLN-T139	160	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACAGCCGCCCTGGGCTGC	1081
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCGCCGCTGGTGCTCTTG	1082
anti-hH ER2-HC-E152-GDSLWLLRLLN-P153	161	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCGTGACCGTGTCTGGA AC	1083
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGGGGAAGTAGTCCTTC ACC	1084
anti-hHER2-HC-P153-GDSLWLLRLLN-V154	162	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGACCGTGTCTGGAACA GCG	1085
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCTCGGGGAAGTAGTCC TTC	1086
anti-hHER2-HC-N159-GDSLWLLRLLN-S160	163	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCG	1087
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTCCAGGACACGGTCACG GG	1088

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-S160-GDSLWLLRLLN-G161	164	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGAGCCCTGACCTCCGGCG TGCAC	1089
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGTTCCAGGACACGGTC ACG	1090
anti-hHER2-HC-G161-GDSLWLLRLLN-A162	165	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCTGACCTCCGGCGTG	1091
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTCCGCTGTTCCAGGACACG G	1092
anti-hHER2-HC-A162-GDSLWLLRLLN-L163	166	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGACCTCCGGCGTGCACA C	1093
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCTCCGCTGTTCCAGGAC AC	1094
anti-hHER2-HC-L163-GDSLWLLRLLN-T164	167	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCTCCGGCGTGCACACCT TC	389
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGGCTCCGCTGTTCCAG G	390
anti-hHER2-HC-T164-GDSLWLLRLLN-S165	168	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTCCGGCGTGCACACCTTCC C	391
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCAGGGCTCCGCTGTTC C	392
anti-hHER2-HC-S165-GDSLWLLRLLN-G166	169	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCGTGCACACCTTCCCCG	393
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGAGGTCAGGGCTCCGCTG	394
anti-hHER2-HC-P171-GDSLWLLRLLN-A172	170	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCGTGCTGCAGAGCAGCG	395
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGAAGGTGTGCACGCCG	396
anti-hHER2-HC-S176-GDSLWLLRLLN-S177	171	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGGCCTGTACAGCCTGT CC	397
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCTGCAGCACGGCGGG	398
anti-hHER2-HC-S177-GDSLWLLRLLN-G178	172	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCCTGTACAGCCTGTCCA GC	399
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTCTGCAGCACGGCG	400
	173	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAGCAGCCTGGGCACCC	401

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-P189-GDSLWLLRLLN-S190		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCACTGTCACCACGCTG G	402
anti-hHER2-HC-S190-GDSLWLLRLLN-S191	174	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAGCCTGGGCACCCAGA C	403
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGCACTGTCACCACG C	404
anti-hHER2-HC-S191-GDSLWLLRLLN-S192	175	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCCTGGGCACCCAGACCT AC	405
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGGGCACTGTCACC AC	406
anti-hHER2-HC-S192-GDSLWLLRLLN-L193	176	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGGGCACCCAGACCTACA TC	407
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGCTGGGCACTGTC AC	408
anti-hHER2-HC-L193-GDSLWLLRLLN-G194	177	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCACCCAGACCTACATCT GC	409
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGCTGCTGCTGGGCACT G	410
anti-hHER2-HC-G194-GDSLWLLRLLN-T195	178	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCCAGACCTACATCTGCAA CGTG	411
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCAGGCTGCTGCTGGG G	412
anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	110	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGACCTACATCTGCAACGT GAAC	413
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTGCCAGGCTGCTGCTG G	414
anti-hHER2-HC-Q196-GDSLWLLRLLN-T197	180	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCTACATCTGCAACGTGAA CCAC	415
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGGGTGCCAGGCTGCTG G	416
anti-hHER2-HC-K205-GDSLWLLRLLN-P206	181	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCAGCAACACCAAGGTGG AC	417
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGTGGTTCAGTTGCAGATGTAG G	418

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-P206-GDSLWLLRLLN-S207	182	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA G	419
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCTTGTGGTTCACGTTG CAG	420
anti-hHER2-HC-S207-GDSLWLLRLLN-N208	183	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTG G	421
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGCTTGTGGTTCACG TTG	422
anti-hHER2-HC-P230-GDSLWLLRLLN-A231	184	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCCAGAGCTGCTGGGC	423
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGGCAGGGGGGGCAGGT G	424
anti-hHER2-HC-A231-GDSLWLLRLLN-P232	185	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCAGAGCTGCTGGGCGGAC	425
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCTGGGCAGGGGGGGC	426
anti-hHER2-HC-P232-GDSLWLLRLLN-E233	186	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGCTGCTGGGCGGACCC	427
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGGGCTGGGCAGGGGGG	428
anti-hHER2-HC-E233-GDSLWLLRLLN-L234	187	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGCTGGGCGGACCCTCC	429
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCTGGGGCTGGGCAGGG	430
anti-hHER2-HC-L234-GDSLWLLRLLN-L235	188	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGGGCGGACCCTCCGTG	431
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGCTCTGGGGCTGGGCAG	432
anti-hHER2-HC-L235-GDSLWLLRLLN-G236	189	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCGGACCCTCCGTGTTCC	433
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGCAGCTCTGGGGCTGGG	434

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-G236-GDSLWLLRLLN-G237	190	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGACCCTCCGTGTTCTGTTCC	435
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCAGCAGCTCTGGGGC	436
anti-hHER2-HC-P244-GDSLWLLRLLN-P245	191	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCAAGCCCAAGGACACCC TG	437
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGAACAGGAACACGGAG GG	438
anti-hHER2-HC-P245-GDSLWLLRLLN-K246	192	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGCCCAAGGACACCCTGA TGATC	439
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGGGGAACAGGAACAC GG	440
anti-hHER2-HC-I253-GDSLWLLRLLN-S254	193	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAGGACCCCCGAGGTGA C	441
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGATCATCAGGGTGTCTTG GGC	442
anti-hHER2-HC-S254-GDSLWLLRLLN-R255	194	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGGACCCCCGAGGTGACCT G	443
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGATCATCAGGGTGTCC TTGG	444
anti-hHER2-HC-R255-GDSLWLLRLLN-T256	195	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCCCCGAGGTGACCTGCG	445
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCTGATCATCAGGGTG TCC	446
anti-hHER2-HC-T256-GDSLWLLRLLN-P257	196	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGG	447
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCTCTGCTGATCATCAGG GTG	448
anti-hHER2-HC-P257-GDSLWLLRLLN-E258	197	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGTGACCTGCGTGGTGG TG	449
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGGTCTCTGCTGATCATC AG	450
anti-hHER2-HC-S267-GDSLWLLRLLN-H268	198	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTC	451
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCACGTCCACCACCACG C	452

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-H268-GDSLWLLRLLN-E269	199	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGACCCAGAGGTGAAGT TCAAC	453
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGGCTCACGTCCACCACC AC	454
anti-hHER2-HC-E269-GDSLWLLRLLN-D270	200	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGACCCAGAGGTGAAGTTCA ACTGG	455
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGTGGCTCACGTCCACC AC	456
anti-hHER2-HC-D270-GDSLWLLRLLN-P271	201	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCAGAGGTGAAGTTCAACT GGTAC	457
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCTCGTGGCTCACGTCC AC	458
anti-hHER2-HC-P271-GDSLWLLRLLN-E272	202	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTG G	459
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGGGTCTCTCGTGGCTCACG TC	460
anti-hHER2-HC-D280-GDSLWLLRLLN-G281	203	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCGTGGAGGTGCACAACG C	461
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCACGTACCAGTTGAACT TCACC	462
anti-hHER2-HC-H285-GDSLWLLRLLN-N286	204	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACGCCAAGACCAAGCCCA GAG	463
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGCACCTCCACGCCGTCC	464
anti-hHER2-HC-N286-GDSLWLLRLLN-A287	205	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCAAGACCAAGCCCAGAG AG	465
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGTGCACCTCCACGCCG TC	466
anti-hHER2-HC-P291-GDSLWLLRLLN-R292	206	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGAGAGGAGCAGTACAACA GCACC	467
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCTTGGTCTTGGCGTTG TG	468

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-T307-GDSLWLLRLLN-V308	207	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGCTGCACCAGGACTGGC TG	469
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCGGTCAGCACGGACACCACC C	470
anti-hHER2-HC-V308-GDSLWLLRLLN-L309	208	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGCACCAGGACTGGCTGA AC	471
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCACGGTCAGCACGGACACC AC	472
anti-hHER2-HC-L309-GDSLWLLRLLN-H310	209	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCACCAGGACTGGCTGAACG GC	473
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCAGCACGGTCAGCACGGAC AC	474
anti-hHER2-HC-H310-GDSLWLLRLLN-Q311	210	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGGACTGGCTGAACGGCA AG	475
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCGTGCAGCACGGTCAGCACG G	476
anti-hHER2-HC-N315-GDSLWLLRLLN-G316	211	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCA AGGTC	477
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCGTTAGCCAGTCCTGGTG C	478
anti-hHER2-HC-G316-GDSLWLLRLLN-K317	212	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCA AC	479
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCGCCGTTAGCCAGTCCTGG TG	480
anti-hHER2-HC-K317-GDSLWLLRLLN-E318	213	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AG	481
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCCTTGCCGTTAGCCAGTCCT G	482
anti-hHER2-HC-K326-GDSLWLLRLLN-A327	214	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCTGCCAGCCCCCATC	483
			484

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGTTGGAGACCTTGCACTTGATT C	
anti-hHER2-HC-A327-GDSLWLLRLLN-L328	215	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGCCAGCCCCCATCGAAAAG	485
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCCTTGTTGGAGACCTTG CAC	486
anti-hHER2-HC-L328-GDSLWLLRLLN-P329	216	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCAGCCCCCATCGAAAAGAC	487
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGGCCTTGTTGGAGACC TTG	488
anti-hHER2-HC-P329-GDSLWLLRLLN-A330	217	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCCCATCGAAAAGACCA TCAG	489
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGCAGGGCCTTGTTGGAG AC	490
anti-hHER2-HC-A330-GDSLWLLRLLN-P331	218	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCATCGAAAAGACCATCAG CAAG	491
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCTGGCAGGGCCTTGTTG G	492
anti-hHER2-HC-A339-GDSLWLLRLLN-K340	219	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGGGCCAGCCACGGGAGC	493
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCCTTGCTGATGGTCTTTT CGATG	494
anti-hHER2-HC-K340-GDSLWLLRLLN-G341	220	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCCAGCCACGGGAGCCCC	495
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGGCCTTGCTGATGGTCT TTTC	496
anti-hHER2-HC-G341-GDSLWLLRLLN-Q342	221	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGCCACGGGAGCCCCAG	497
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCTTGGCCTTGCTGATG GTC	498
anti-hHER2-HC-Q342-GDSLWLLRLLN-P343	222	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCACGGGAGCCCCAGGTG	499
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGGCCCTTGGCCTTGCTG ATG	500
anti-hHER2-HC-P343-	223	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCGGGAGCCCCAGGTGTACA C	501

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
GDSLWLLRLLN-R344		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGCTGGCCCTTGGCCTTG C	502
anti-hHER2-HC-R344-GDSLWLLRLLN-E345	224	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGCCCCAGGTGTACACCC TG	503
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCGTGGCTGGCCCTTGGC	504
anti-hHER2-HC-R355-GDSLWLLRLLN-E356	225	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTG	505
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCGGGAGGGGGGCAGGG	506
anti-hHER2-HC-E356-GDSLWLLRLLN-E357	226	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCC	507
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCCGGGAGGGGGGCAG	508
anti-hHER2-HC-E357-GDSLWLLRLLN-M358	227	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACATGACCAAGAACCAGGTGT CCCTG	509
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCTCCCGGGAGGGGGG	510
anti-hHER2-HC-M358-GDSLWLLRLLN-T359	228	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCAAGAACCAGGTGTCCC TGAC	511
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCATCTCCTCCCGGGAGGGG	512
anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360	121	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGAACCAGGTGTCCCTGA CCTG	513
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCATCTCCTCCCGGGAG G	514
anti-hHER2-HC-K360-GDSLWLLRLLN-N361	229	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACCAGGTGTCCCTGACCT GTC	515
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGGTCATCTCCTCCCGG GAG	516
anti-hHER2-HC-N384-GDSLWLLRLLN-G385	230	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TAC	517
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGCTCTCCCACTCCACG GC	518
anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	127	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACAACACTACAAGACCACAC TCCAG	519
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	520

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-N389-GDSLWLLRLLN-N390	231	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACTACAAGACCACACCTCC AGTGC	521
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTCTCGGGCTGGCCGTTG C	522
anti-hHER2-HC-T394-GDSLWLLRLLN-P395	232	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCTCCAGTGCTGGACAGCG AC	523
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGTGGTCTTGTAGTTGTTCT CGGGC	524
anti-hHER2-HC-P395-GDSLWLLRLLN-P396	233	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCAGTGCTGGACAGCGACG G	525
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCAGGTGTGGTCTTGTAGTTGT TCTCG	526
anti-hHER2-HC-D399-GDSLWLLRLLN-S400	234	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TG	527
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCAGCACTGGAGGTGTG GTC	528
anti-hHER2-HC-S400-GDSLWLLRLLN-D401	136	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGACGGCAGCTTCTTCCTGTA CAG	529
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGTCCAGCACTGGAGGT GTG	530
anti-hHER2-HC-D401-GDSLWLLRLLN-G402	235	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCAGCTTCTTCCTGTACAG CAAG	531
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCGCTGTCCAGCACTGGA GG	532
anti-hHER2-HC-S415-GDSLWLLRLLN-R416	236	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGGTGGCAGCAGGGCAACG TG	533
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGAATTGTCCACGGTCAGC TTG	534
anti-hHER2-HC-R416-GDSLWLLRLLN-W417	237	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTGGCAGCAGGGCAACGTGT TC	535
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGGACTTGTCCACGGTC AG	536
anti-hHER2-HC-W417-	238	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGCAGGGCAACGTGTTCA GC	537

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
GDSLWLLRLLN-Q418		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCACCTGGACTTGTCACG GTC	538
anti-hHER2-HC-Q418-GDSLWLLRLLN-Q419	239	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGGGCAACGTGTTCAGCT GC	539
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCCACCTGGACTTGTC AC	540
anti-hHER2-HC-Q419-GDSLWLLRLLN-G420	240	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCAACGTGTTCAGCTGCA GC	541
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCTGCCACCTGGACTTG TC	542
anti-hHER2-HC-G420-GDSLWLLRLLN-N421	241	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACGTGTTCAGCTGCAGCG TGATG	543
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCTGCTGCCACCTGGAC	544
anti-hHER2-HC-N421-GDSLWLLRLLN-V422	242	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGA TGC	545
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGCCCTGCTGCCACCTG G	546
anti-hHER2-HC-H433-GDSLWLLRLLN-N434	243	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACCACTACACCCAGAAGA GCCTG	547
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGCAGGGCCTCGTGCATC AC	548
anti-hHER2-HC-N434-GDSLWLLRLLN-H435	244	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCACTACACCCAGAAGAGCC TGAG	549
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGTGCAGGGCCTCGTGC ATC	550
anti-hHER2-HC-S442-GDSLWLLRLLN-L443	245	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGTCCCCCGCAAGTAAT CTAG	551
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCAGGCTCTTCTGGGTG TAG	552
anti-hHER2-HC-L443-GDSLWLLRLLN-S444	246	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTCCCCCGCAAGTAATCTAG ACAC	553
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGCTCAGGCTCTTCTGG GTG	554

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-S444-GDSLWLLRLLN-P445	247	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCGGCAAGTAATCTAGACA CCTC	555
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGACAGGCTCAGGCTCTTC TG	556
anti-hHER2-HC-P445-GDSLWLLRLLN-G446	248	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCAAGTAATCTAGACACCT CAGAC	557
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGGACAGGCTCAGGCTC	558
anti-hHER2-HC-G446-GDSLWLLRLLN-K447	139	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGTAATCTAGACACCTCAGACAAT CAAC	559
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCGGGGGACAGGCTCAG	560
anti-hHER2-HC-A118-DSLEFIASKLA-S119	249	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCG	561
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCAGCCGAGGAGACGGTGACC AG	562
anti-hHER2-HC-S119-DSLEFIASKLA-T120	250	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCAAGGGCCCCAGCGTGT TC	563
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTAGCCGAGGAGACGGTG AC	564
anti-hHER2-HC-T120-DSLEFIASKLA-K121	251	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGGGCCCCAGCGTGTTC C	565
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTGCTAGCCGAGGAGACG G	566
anti-hHER2-HC-S131-DSLEFIASKLA-S132	252	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAAGAGCACCAGCGGGC G	567
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGGGCCAGGGGGAAC	568
anti-hHER2-HC-S132-DSLEFIASKLA-K133	253	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGAGCACCAGCGGCGGCA C	569
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGCTGGGGGCCAGGGG	570
anti-hHER2-HC-K133-DSLEFIASKLA-S134	254	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCACCAGCGGCGGCACAG	571
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGCTGCTGGGGGCCAGG	572

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-S134-DSLEFIASKLA-T135	255	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCAGCGGCGGCACAGCC	573
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCTTGCTGCTGGGGGCC	574
anti-hHER2-HC-T135-DSLEFIASKLA-S136	256	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGGCGGCACAGCCGCC	575
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTGCTCTTGCTGCTGGGGG	576
anti-hHER2-HC-S136-DSLEFIASKLA-137	257	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCGGCGGCACAGCCGCCCTG	577
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGTGCTCTTGCTGCTGG	578
anti-hHER2-HC-G137-DSLEFIASKLA-G138	258	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCGCACAGCCGCCCTGGGC	579
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCGCTGGTGCTCTTGCTGC	580
anti-hHER2-HC-G138-DSLEFIASKLA-T139	259	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACAGCCGCCCTGGGCTGC	581
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCGCGCTGGTGCTCTTG	582
anti-hHER2-HC-E152-DSLEFIASKLA-P153	260	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGTGACCGTGTCTGGAAC	583
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGGGAAGTAGTCCTTCA	584
anti-hHER2-HC-P153-DSLEFIASKLA-V154	261	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTGACCGTGTCTGGAACA	585
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCTCGGGGAAGTAGTCC	586
anti-hHER2-HC-N159-DSLEFIASKLA-S160	262	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGGAGCCCTGACCTCCG	587
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTCCAGGACACGGTCACG	588
anti-hHER2-HC-S160-DSLEFIASKLA-G161	263	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGAGCCCTGACCTCCGGCG	589
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGTTCCAGGACACGGTCA	590
	264	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCTGACCTCCGGCGTG	591

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-G161-DSLEFIASKLA-A162		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTCCGCTGTTCCAGGACACG G	592
anti-hHER2-HC-A162-DSLEFIASKLA-L163	265	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGACCTCCGGCGTGCACA C	593
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGCTCCGCTGTTCCAGGAC AC	594
anti-hHER2-HC-L163-DSLEFIASKLA-T164	266	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCTCCGGCGTGCACACCT TC	595
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGGCTCCGCTGTTCCAG G	596
anti-hHER2-HC-T164-DSLEFIASKLA-S165	267	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCACACCTTCC C	597
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGTCAGGGCTCCGCTGTTC C	598
anti-hHER2-HC-S165-DSLEFIASKLA-G166	268	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCGTGCACACCTTCCCCG	599
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGAGGTCAGGGCTCCGCTG	600
anti-hHER2-HC-P171-DSLEFIASKLA-A172	269	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCG	601
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGGAAGGTGTGCACGCCG	602
anti-hHER2-HC-S176-DSLEFIASKLA-S177	270	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGGCCTGTACAGCCTGT CC	603
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGCTCTGCAGCACGGCGGG	604
anti-hHER2-HC-S177-DSLEFIASKLA-G178	271	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCCTGTACAGCCTGTCCA GC	605
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGCTGCTCTGCAGCACGGCG	606
anti-hHER2-HC-P189-DSLEFIASKLA-S190	272	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCC	607
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGCACTGTACCACGCTG G	608
anti-hHER2-HC-S190-	273	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAGCCTGGGCACCCAGA C	609

ES 2 703 540 T3

Nombre secuencia	de	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
DSLEFIASKLA-S191			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGCACTGTCACCACG C	610
anti-hHER2-HC-S191- DSLEFIASKLA-S192	274		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCCTGGGCACCCAGACCT AC	611
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGCTGGGCACTGTCACC AC	612
anti-hHER2-HC-S192- DSLEFIASKLA-L193	275		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGGGCACCCAGACCTACA TC	613
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGCTGCTGGGCACTGTC AC	614
anti-hHER2-HC-L193- DSLEFIASKLA-G194	276		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCACCCAGACCTACATCT GC	615
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGCTGCTGCTGGGCACT G	616
anti-hHER2-HC-G194- DSLEFIASKLA-T195	277		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTG	617
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCAGGCTGCTGCTGGG G	618
anti-hHER2-HC-T195- DSLEFIASKLA-Q196	278		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGACCTACATCTGCAACGT GAAC	619
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTGCCCAGGCTGCTGCTG G	620
anti-hHER2-HC-Q196- DSLEFIASKLA-T197	279		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCTACATCTGCAACGTGAA CCAC	621
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGGGTGCCCAGGCTGCTG G	622
anti-hHER2-HC-K205- DSLEFIASKLA-P206	280		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGCAACACCAAGGTGG AC	623
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGTGGTTCACGTTGCAGATGTAG G	624
anti-hHER2-HC-P206- DSLEFIASKLA-S207	281		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA G	625
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCTTGTGGTTCACGTTGC AG	626

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-S207-DSLEFIASKLA-N208	282	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTG G	627
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGCTTGTGGTTCACGT TG	628
anti-hHER2-HC-P230-DSLEFIASKLA-A231	283	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCCAGAGCTGCTGGGC	629
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGCAGGGGGGGCAGGT G	630
anti-hHER2-HC-A231-DSLEFIASKLA-P232	284	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGAC	631
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCTGGGCAGGGGGGGC	632
anti-hHER2-HC-P232-DSLEFIASKLA-E233	285	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGCTGCTGGGCGGACCC	633
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGGCTGGGCAGGGGGG	634
anti-hHER2-HC-E233-DSLEFIASKLA-L234	286	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGCTGGGCGGACCCTCC	635
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCTGGGGCTGGGCAGGG	636
anti-hHER2-HC-L234-DSLEFIASKLA-L235	287	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGGGCGGACCCTCCGTG	637
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGCTCTGGGGCTGGGCAG	638
anti-hHER2-HC-L235-DSLEFIASKLA-G236	288	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCGGACCCTCCGTGTTCC	639
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGCAGCTCTGGGGCTGGG	640
anti-hHER2-HC-G236-DSLEFIASKLA-G237	289	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGACCCTCCGTGTTCTGTT CC	641
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCAGCAGCTCTGGGGC	642
anti-hHER2-HC-P244-DSLEFIASKLA-P245	290	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCAAGCCCAAGGACACCC TG	643
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGAACAGGAACACGGAG GG	644
anti-hHER2-HC-P245-DSLEFIASKLA-K246	291	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGCCCAAGGACACCCTGA TGATC	645
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGGGGAACAGGAACACG G	646

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-I253-DSLEFIASKLA-S254	292	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAGGACCCCCGAGGTGAC	647
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGATCATCAGGGTGTCTTGGC	648
anti-hHER2-HC-S254-DSLEFIASKLA-R255	293	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGGACCCCCGAGGTGACCTG	649
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGCTGATCATCAGGGTGTCTTGG	650
anti-hHER2-HC-R255-DSLEFIASKLA-T256	294	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCCCCGAGGTGACCTGCG	651
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTCTGCTGATCATCAGGGTGTCC	652
anti-hHER2-HC-T256-DSLEFIASKLA-P257	295	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGAGGTGACCTGCGTGG	653
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGTCTCTGCTGATCATCAGG	654
anti-hHER2-HC-P257-DSLEFIASKLA-E258	296	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGTGACCTGCGTGGTGG	655
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGGTCTCTGCTGATCATC	656
anti-hHER2-HC-S267-DSLEFIASKLA-H268	297	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCACGAGGACCCAGAGGTGAC	657
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGCTCACGTCCACCACCACG	658
anti-hHER2-HC-H268-DSLEFIASKLA-E269	298	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGACCCAGAGGTGAAGT	659
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGCTCACGTCCACCACC	660
anti-hHER2-HC-E269-DSLEFIASKLA-D270	299	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGACCCAGAGGTGAAGTTCA	661
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTCTGCTGGGCTCACGTCCACCA	662
anti-hHER2-HC-D270-DSLEFIASKLA-P271	300	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGAGGTGAAGTTCAACT	663
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTCTCTGCTGGGCTCACGTCCA	664

ES 2 703 540 T3

Nombre secuencia	de	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC- P271- DSLEFIASKLA- E272	301		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ACGTGG	665
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGTCTCTCGTGGCTCACG TC	666
anti-hHER2-HC- D280- DSLEFIASKLA- G281	302		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCGTGGAGGTGCACAACG C	667
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGTCACGTACCAGTTGAACT TCACC	668
anti-hHER2-HC- H285- DSLEFIASKLA- N286	303		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACGCCAAGACCAAGCCCA GAG	669
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGTCACCTCCACGCCGTCC	670
anti-hHER2-HC- N286- DSLEFIASKLA- A287	304		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCAAGACCAAGCCCAGAG AG	671
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGTTGTGCACCTCCACGCCGT C	672
anti-hHER2-HC- P291- DSLEFIASKLA- R292	305		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGAGAGGAGCAGTACAACA GCACC	673
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGCTTGGTCTTGCGTTGT G	674
anti-hHER2-HC- T307- DSLEFIASKLA- V308	306		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTGCTGCACCAGGACTGGC TG	675
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGTCAGCACGGACACCACC C	676
anti-hHER2-HC- V308- DSLEFIASKLA- L309	307		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGCACCAGGACTGGCTGA AC	677
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACGGTCAGCACGGACACC AC	678
anti-hHER2-HC- L309- DSLEFIASKLA- H310	308		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCACCAGGACTGGCTGAACG GC	679
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGCACGGTCAGCACGGAC AC	680
anti-hHER2-HC- H310-	309		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGGACTGGCTGAACGGCA AG	681

ES 2 703 540 T3

Nombre secuencia	de	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
DSLEFIASKLA- Q311			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGCAGCACGGTCAGCACG G	682
anti-hHER2-HC- N315- DSLEFIASKLA- G316	310		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCAAGGAATACAAGTGCA AGGTC	683
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTTCAGCCAGTCCTGGTGCA G	684
anti-hHER2-HC- G316- DSLEFIASKLA- K317	311		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCA AC	685
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCGTTTCAGCCAGTCCTGG TG	686
anti-hHER2-HC- K317- DSLEFIASKLA- E318	312		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AG	687
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGCCGTTTCAGCCAGTCCT G	688
anti-hHER2-HC- K326- DSLEFIASKLA- A327	313		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCTGCCAGCCCCCATC	689
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGTTGGAGACCTTGCACTTGATT C	690
anti-hHER2-HC- A327- DSLEFIASKLA- L328	314		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAA AG	691
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCCTTGTTGGAGACCTTGC AC	692
anti-hHER2-HC- L328- DSLEFIASKLA- P329	315		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGCCCCCATCGAAAAGA CC	693
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGGCCTTGTTGGAGACC TTG	694
anti-hHER2-HC- P329-	316		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCCCCATCGAAAAGACCA TCAG	695

ES 2 703 540 T3

Nombre secuencia	de	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
DSLEFIASKLA-A330			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGCAGGGCCTTGTGGAGAC	696
anti-hHER2-HC-A330- DSLEFIASKLA-P331	317		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCATCGAAAAGACCATCA GCAAG	697
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGCTGGCAGGGCCTTGTG G	698
anti-hHER2-HC-A339- DSLEFIASKLA-K340	318		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC	699
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGCCTTGCTGATGGTCTTT CGATG	700
anti-hHER2-HC-K340- DSLEFIASKLA-G341	319		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCCAGCCACGGGAGCCC	701
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGCCTTGCTGATGGTCT TTTC	702
anti-hHER2-HC-G341- DSLEFIASKLA-Q342	320		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGCCACGGGAGCCCCAG	703
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGCCTTGCTGATG GTC	704
anti-hHER2-HC-Q342- DSLEFIASKLA-P343	321		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCACGGGAGCCCCAGGTG	705
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGCCTTGCTGA TG	706
anti-hHER2-HC-P343- DSLEFIASKLA-R344	322		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCGGGAGCCCCAGGTGTACA C	707
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGCTGGCCCTTGCCCTTG C	708
anti-hHER2-HC-R344- DSLEFIASKLA-E345	323		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGCCCCAGGTGTACACCC TG	709
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCGTGGCTGGCCCTTGCC	710
anti-hHER2-HC-R355- DSLEFIASKLA-E356	324		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTG	711
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCGGGAGGGGGGCAGGG	712
anti-hHER2-HC-E356- DSLEFIASKLA-E357	325		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCC	713
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTCCCGGGAGGGGGGCAG	714

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-E357-DSLEFIASKLA-M358	326	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG	715
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCCTCCCGGGAGGGGGG	716
anti-hHER2-HC-M358-DSLEFIASKLA-T359	327	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCAAGAACCAGGTGTCCC TGAC	717
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCATCTCCTCCCGGGAGGGG	718
anti-hHER2-HC-T359-DSLEFIASKLA-K360	122	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGAACCAGGTGTCCCTGA CCTG	719
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTCATCTCCTCCCGGGAG G	720
anti-hHER2-HC-K360-DSLEFIASKLA-N361	328	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACCAGGTGTCCCTGACCT GTC	721
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGGTCATCTCCTCCCGGG AG	722
anti-hHER2-HC-N384-DSLEFIASKLA-G385	329	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCCAGCCCGAGAACAAC TAC	723
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGCTCTCCCACTCCACGG C	724
anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	129	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACAAC TACAAGACCACACC TCCAG	725
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	726
anti-hHER2-HC-N389-DSLEFIASKLA-N390	330	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAC TACAAGACCACACCTCC AGTGC	727
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTCTCGGGCTGGCCGTTG C	728
anti-hHER2-HC-T394-DSLEFIASKLA-P395	331	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCTCCAGTGCTGGACAGCG AC	729
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGTGGTCTTG TAGTTGTTCT CGGGC	730
anti-hHER2-HC-P395-DSLEFIASKLA-P396	332	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGTGCTGGACAGCGACG G	731
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCAGGTGTGGTCTTG TAGTTGT TCTCG	732

Nombre secuencia	de	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC- D399- DSLEFIASKLA- S400		333	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGACGGCAGCTTCTTCC TG	733
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGTCAGCACTGGAGGTGTG GTC	734
anti-hHER2-HC- S400- DSLEFIASKLA- D401		334	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAG CAG	735
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGCTGTCCAGCACTGGAGGT GTG	736
anti-hHER2-HC- D401- DSLEFIASKLA- G402		335	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCAGCTTCTTCCTGTACAG CAAG	737
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGCTGTCCAGCACTGGA GG	738
anti-hHER2-HC- S415- DSLEFIASKLA- R416		336	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGGTGGCAGCAGGGCAACG TG	739
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGACTTGTCCACGGTCAGCT TG	740
anti-hHER2-HC- R416- DSLEFIASKLA- W417		337	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTGGCAGCAGGGCAACGTGT TC	741
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCTGGACTTGTCCACGGTCA G	742
anti-hHER2-HC- W417- DSLEFIASKLA- Q418		338	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGCAGGGCAACGTGTTCA GC	743
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACCTGGACTTGTCCACG GTC	744
anti-hHER2-HC- Q418- DSLEFIASKLA- Q419		339	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGGGCAACGTGTTCACT GC	745
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCTGCCACCTGGACTTGTCCA C	746
anti-hHER2-HC- Q419- DSLEFIASKLA- G420		340	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCAACGTGTTCACTGCA GC	747
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGCTGCCACCTGGACTTGT C	748
anti-hHER2-HC- G420-		341	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACGTGTTCACTGCAGCG TGATG	749

ES 2 703 540 T3

Nombre secuencia	de	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
DSLEFIASKLA- N421			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCTGCTGCCACCTGGAC	750
anti-hHER2-HC- N421- DSLEFIASKLA- V422	342		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTGTTCACTGTCAGCGTGA TGC	751
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGCCCTGCTGCCACCTG G	752
anti-hHER2-HC- H433- DSLEFIASKLA- N434	343		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACCACTACACCCAGAAGA GCCTG	753
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGCAGGGCCTCGTGCATC AC	754
anti-hHER2-HC- N434- DSLEFIASKLA- H435	344		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCACTACACCCAGAAGAGCC TGAG	755
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGTGCAGGGCCTCGTGC ATC	756
anti-hHER2-HC- S442- DSLEFIASKLA- L443	345		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGTCCCCCGGCAAGTAAT CTAG	757
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCAGGCTCTTCTGGGTGT AG	758
anti-hHER2-HC- L443- DSLEFIASKLA- S444	346		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTCCCCCGGCAAGTAATCTA GACAC	759
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGCTCAGGCTCTTCTGG GTG	760
anti-hHER2-HC- S444- DSLEFIASKLA- P445	347		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGGCAAGTAATCTAGAC ACCTC	761
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGACAGGCTCAGGCTCTTCT G	762
anti-hHER2-HC- P445- DSLEFIASKLA- G446	348		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCAAGTAATCTAGACACCT CAGAC	763
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGGACAGGCTCAGGCTC G	764
anti-hHER2-HC- G446- DSLEFIASKLA- K447	349		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGTAATCTAGACACCTCAGACAAT CAAC	765
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCGGGGGACAGGCTCAG G	766
	31		CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGGCCGCTCCCAGCGTG	767

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-LC-T109-GDSLWLLRLLN-V110		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCGTTGTTTGATCTCCACCT TGGT	768
anti-hHER2-LC-V110-GDSLWLLRLLN-A111	32	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCGCTCCCAGCGTGTTCA TC	769
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCACCGTTGTTTGATCTCCA CCTTG	770
anti-hHER2-LC-A111-GDSLWLLRLLN-A112	33	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCTCCCAGCGTGTTTCATCTT CC	771
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCCACCGTTGTTTGATCT CC	772
anti-hHER2-LC-P119-GDSLWLLRLLN-P120	34	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCAGCGACGAGCAGCTGA AG	773
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGAAGATGAACACGCTG GG	774
anti-hHER2-LC-P120-GDSLWLLRLLN-S121	35	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGACGAGCAGCTGAAGA GC	775
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGGGGAAGATGAACACG CTG	776
anti-hHER2-LC-S121-GDSLWLLRLLN-D122	36	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGACGAGCAGCTGAAGAGCG GC	777
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGGGGGAAGATGAAC AC	778
anti-hHER2-LC-D122-GDSLWLLRLLN-E123	37	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGCAGCTGAAGAGCGGCA CC	779
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCGCTGGGGGGGAAGATG AAC	780
anti-hHER2-LC-Y140-GDSLWLLRLLN-P141	38	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCCGGGAGGCCAAGGTG	781
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTAGAAGTTGTTTCAGCAGG CACAC	782
anti-hHER2-LC-P141-GDSLWLLRLLN-R142	39	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCGGGAGGCCAAGGTGCAGT G	783
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGTAGAAGTTGTTTCAGC AGGC	784

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-LC-R142-GDSLWLLRLLN-E143	40	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGCCAAGGTGCAGTGAAG	785
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCGGGGGTAGAAGTTGTTC	786
anti-hHER2-LC-E143-GDSLWLLRLLN-A144	41	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCAAGGTGCAGTGAAGG	787
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCCGGGGGTAGAAGTTG	788
anti-hHER2-LC-D151-GDSLWLLRLLN-N152	42	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACGCCCTGCAGAGCGGCA	789
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCACCTTCCACTGCACCT	790
anti-hHER2-LC-N152-GDSLWLLRLLN-A153	43	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCTGCAGAGCGGCAACA	791
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGTCCACCTTCCACTGCA	792
anti-hHER2-LC-A153-GDSLWLLRLLN-L154	44	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGCAGAGCGGCAACAGCC	793
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCGTTGTCCACCTTCCACT	794
anti-hHER2-LC-L154-GDSLWLLRLLN-Q155	45	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGAGCGGCAACAGCCAGG	795
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGGCGTTGTCCACCTTC	796
anti-hHER2-LC-Q155-GDSLWLLRLLN-S156	46	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGGCAACAGCCAGGAGA	797
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCAGGGCGTTGTCCACC	798
anti-hHER2-LC-E161-GDSLWLLRLLN-S162	47	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGTCACCGAGCAGGACA	799
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCTGGCTGTTGCCGCTC	800
anti-hHER2-LC-S162-	48	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTCACCGAGCAGGACAGCA	801

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
GDSLWLLRLLN-V163		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCTCCTGGCTGTTGCCG C	802
anti-hHER2-LC-V163-GDSLWLLRLLN-T164	49	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCGAGCAGGACAGCAAGG AC	803
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGACGCTCTCCTGGCTGTTG CC	804
anti-hHER2-LC-T164-GDSLWLLRLLN-E165	50	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGCAGGACAGCAAGGACT CC	805
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTGACGCTCTCCTGGCTG TTG	806
anti-hHER2-LC-E165-GDSLWLLRLLN-Q166	51	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGGACAGCAAGGACTCCA CC	807
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGGTGACGCTCTCCTGG C	808
anti-hHER2-LC-Q166-GDSLWLLRLLN-D167	52	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGACAGCAAGGACTCCACCT ACAG	809
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCTCGGTGACGCTCTCC TG	810
anti-hHER2-LC-D167-GDSLWLLRLLN-S168	53	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAAGGACTCCACCTACA GCC	811
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCTGCTCGGTGACGCTC TC	812
anti-hHER2-LC-T197-GDSLWLLRLLN-H198	54	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCACCAGGGCCTGTCCAGCC	813
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCACCTCGCAGGCGTAC AC	814
anti-hHER2-LC-H198-GDSLWLLRLLN-Q199	55	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGGGCCTGTCCAGCCCC	815
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGGGTACCTCGCAGGCG	816
anti-hHER2-LC-Q199-GDSLWLLRLLN-G200	56	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCCTGTCCAGCCCCGTG	817
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGGTGGGTACCTCGCAG G	818
anti-hHER2-LC-G200-	57	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGTCCAGCCCCGTGACCA AG	819

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
GDSLWLLRLLN-L201		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCTGGTGGGTACCTCG	820
anti-hHER2-LC-L201-GDSLWLLRLLN-S202	58	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTCCAGCCCCGTGACCAAGA GC	821
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGCCCTGGTGGGTACACC	822
anti-hHER2-LC-S202-GDSLWLLRLLN-S203	59	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCCCCGTGACCAAGAGCT TC	823
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGACAGGCCCTGGTGGGTGTC	824
anti-hHER2-LC-S203-GDSLWLLRLLN-P204	60	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCGTGACCAAGAGCTTCA ACAG	825
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGACAGGCCCTGGTGG	826
anti-hHER2-LC-K207-GDSLWLLRLLN-S208	61	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC	827
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGGTCACGGGGCTGGAC AG	828
anti-hHER2-LC-T109-DSLEFIASKLA-V110	62	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTGGCCGCTCCCAGCGTG	829
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCGTTTCGTTTGATCTCCACCT TGGT	830
anti-hHER2-LC-V110-DSLEFIASKLA-A111	63	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCGCTCCCAGCGTGTTCA TC	831
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACCGTTTCGTTTGATCTCCA CCTTG	832
anti-hHER2-LC-A111-DSLEFIASKLA-A112	64	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTT CC	833
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCGCCACCGTTTCGTTTGATCT CC	834
anti-hHER2-LC-P119-DSLEFIASKLA-P120	65	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGCGACGAGCAGCTGA AG	835
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCGGGAAGATGAACACGCTG GG	836
anti-hHER2-LC-P120-	66	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGACGAGCAGCTGAAGA GC	837

ES 2 703 540 T3

Nombre secuencia	de	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
DSLEFIASKLA-S121			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGGGGAAGATGAACACGCTG	838
anti-hHER2-LC-S121- DSLEFIASKLA-D122	67		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGC	839
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGGGGGAAGATGAACAC	840
anti-hHER2-LC-D122- DSLEFIASKLA-E123	68		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGCAGCTGAAGAGCGGCCA	841
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCGCTGGGGGGGAAGATGAAC	842
anti-hHER2-LC-Y140- DSLEFIASKLA-P141	69		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGGGAGGCCAAGGTG	843
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTAGAAGTTGTTTCAGCAGGCACAC	844
anti-hHER2-LC-P141- DSLEFIASKLA-R142	70		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTG	845
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGTAGAAGTTGTTTCAGCAGGC	846
anti-hHER2-LC-R142- DSLEFIASKLA-E143	71		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG	847
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCGGGGGTAGAAGTTGTTTCAGC	848
anti-hHER2-LC-E143- DSLEFIASKLA-A144	72		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG	849
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCCCGGGGGTAGAAGTTGTTC	850
anti-hHER2-LC-D151- DSLEFIASKLA-N152	73		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACGCCCTGCAGAGCGGCCAAC	851
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCCACCTTCCACTGCACCTTG	852
anti-hHER2-LC-N152- DSLEFIASKLA-A153	74		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCTGCAGAGCGGCCAACAG	853
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGTCCACCTTCCACTGCACCC	854

ES 2 703 540 T3

Nombre secuencia	de	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-LC-A153- DSLEFIASKLA-L154	75		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG	855
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCGTTGTCCACCTTCCACTG	856
anti-hHER2-LC-L154- DSLEFIASKLA-Q155	76		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGAGCGGCAACAGCCAGGAG	857
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGGCGTTGTCCACCTTCCAC	858
anti-hHER2-LC-Q155- DSLEFIASKLA-S156	77		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC	859
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGCAGGGCGTTGTCCACCTTC	860
anti-hHER2-LC-E161- DSLEFIASKLA-S162	78		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAGC	861
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCCTGGCTGTTGCCGCTCTG	862
anti-hHER2-LC-S162- DSLEFIASKLA-V163	79		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTCACCGAGCAGGACAGCAGCAG	863
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCTCCTGGCTGTTGCCGCTC	864
anti-hHER2-LC-V163- DSLEFIASKLA-T164	80		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCGAGCAGGACAGCAAGGAC	865
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGACGCTCTCCTGGCTGTTGCCG	866
anti-hHER2-LC-T164- DSLEFIASKLA-E165	81		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC	867
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTGACGCTCTCCTGGCTGTTG	868
anti-hHER2-LC-E165- DSLEFIASKLA-Q166	82		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGGACAGCAAGGACTCCAC	869
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGTGACGCTCTCCTGGCTC	870
anti-hHER2-LC-Q166-	83		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGACAGCAAGGACTCCACCTACAG	871

Nombre secuencia	de	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
DSLEFIASKLA-D167			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGCTCGGTGACGCTCTCCTG	872
anti-hHER2-LC-D167- DSLEFIASKLA-S168	84		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAAGGACTCCACCTACAGCC	873
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCCTGCTCGGTGACGCTCTC	874
anti-hHER2-LC-T197- DSLEFIASKLA-H198	85		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCACCAGGGCCTGTCCAGCC	875
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTCACCTCGCAGGCGTACAC	876
anti-hHER2-LC-H198- DSLEFIASKLA-Q199	86		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGGGCCTGTCCAGCCCC	877
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGGGTACCTCGCAGGCG	878
anti-hHER2-LC-Q199- DSLEFIASKLA-G200	87		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCCTGTCCAGCCCCGTG	879
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGGTGGGTACCTCGCAGG	880
anti-hHER2-LC-G200- DSLEFIASKLA-L201	88		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG	881
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCTGGTGGGTACCTCG	882
anti-hHER2-LC-L201- DSLEFIASKLA-S202	89		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTCCAGCCCCGTGACCAAGAGGC	883
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGCCCTGGTGGGTACACC	884
anti-hHER2-LC-S202- DSLEFIASKLA-S203	90		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC	885
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGACAGGCCCTGGTGGGTG	886
anti-hHER2-LC-S203- DSLEFIASKLA-P204	91		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAG	887
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGACAGGCCCTGGTGG	888
anti-hHER2-LC-K207- DSLEFIASKLA-S208	92		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC	889
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGGTCACGGGGCTGGACAG	890
			GAAGGAGATATACATATGAAAATTTATGGGATTTACATGGATCGC	891

ES 2 703 540 T3

Nombre secuencia	de	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
<i>B. subtilis</i> pET22b	Sfp		GTGGTGGTGGTGGTGGTGCAGCAATTCTTCATAGGAGACCATCG	892
pET22b			CACCACCACCACCACCACTGAG	893
			CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTT	894
TEV into <i>B. subtilis</i> Sfp			GAGAACCTGTACTTCCAAGGCCACCACCACCACCACTGAG	895
pET22b			GCCTTGGAAGTACAGGTTCTCCAGCAATTCTTCATAGGAGACCATCG	896
<i>B. subtilis</i> Sfp K28E			GTCTTTCATTTACCAGAGGAGCGCGAAAAATGCCGTCGCT	897
			AGCGACGGCATTTCGCGCTCCTCTGGTGAAATGAAAGAC	898
<i>B. subtilis</i> Sfp T44E			AAAGAAGATGCTCACCGCGAGCTGCTGGGAGATGTGCTG	899
			CAGCACATCTCCCAGCAGCTCGCGGTGAGCATCTTCTTT	900
<i>B. subtilis</i> Sfp C77Y			GCAGGAATATGGCAAACCGTATATTCCAGATCTTCCAGATGC	901
			GCATCTGGAAGATCTGGAATATACGGTTTGCCATATTCCTGC	902
<i>E. coli</i> AcpS pET22b			AATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCAATATTAGGTTT AGGCACG	903
			CAGTGGTGGTGGTGGTGGTGACTTTCAATAATTACCGTGGCACAAGC	904
pET22b			CACCACCACCACCACCACTG	905
			ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATT	906
anti-hHER2-HC- V64L-EFIASKLA- K65	99		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGGGCCGTTTCACTATAAG CGC	907
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTATCGGCATATCTAGTATAACCATTCGTAG G	908
anti-hHER2-HC- S63-LEFIASK-V64	97		GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGGTCAAGGGCCGTTTCACTAT AAGC	909
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCATATCTAGTATAACCATTCGTAG G	910

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-V64L-EFIAS-K65	98	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCG CAGAC	911
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCATATCTAGTATAACCATTCTAG G	912
anti-hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79	30	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATT AC	913
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGATGGTCAGAGTGAAATCCG TCC	914
anti-hHER2-HC-S132G-K133D-S134-T135L-S136-G137W-G138L-T139L-A140R-A141L-L142-G143N	101	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTGCCTGGTGAAGGACTACTT CC	915
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGGGCCAGGGGG	916
anti-hHER2-HC-K133G-S134D-T135S-S136L-G137S-G138W-LLRLLN-T139	103	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACAGCCGCCCTGGGCTGC	917
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGGGGGCCAGGG	918
anti-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L	105	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGGCCCTGGGCTGCCTGGTG	919
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCTGCTGGGGGCCAGG	920
anti-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140LLRLLN-A141	106	CTGAGACTGCTGAACGCCCTGGGCTGCCTGGTG	921
		GTTCAGCAGTCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGC	922
anti-hHER2-HC-T135G-S136D-G137S-G138L-T139S-WLLRLLN-A140	108	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCGCCCTGGGCTGCCTG	923
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCTTGCTGCTGGGGGCC	924
anti-hHER2-HC-T359G-K360D-N361S-Q362L-V363S-S364W	123	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTC	925
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCATCTCCTCCCGGGAGGGG	926

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-S132G-K133D-S134-T135L-S136-G137W-G138L	100	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGACAGCCGCCCTGGGCTGC	927
		CAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCGCTGGGGGCCAGGGGG	928
anti-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L-A141L-L142R-G143L-C144L-L145N	107	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGAAGGACTACTTCCCCGAGC	929
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCCTTGCTGCTGGGGGCCAGG	930
anti-hHER2-HC-L193G-G194D-T195S-Q196L-T197S-Y198W-1199L	117	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG	931
		CAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCGCTGCTGCTGGGCACTGTC	932
anti-hHER2-HC-L193G-G194D-T195S-Q196L-T197S-Y198W-1199LLRLN-C200	118	CTGAGACTGCTGAACTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG	933
		GTTCAGCAGTCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGC	934
anti-hHER2-HC-L193G-G194D-T195S-Q196L-T197S-Y198W-1199L-C200L-N201R-V202L-N203L-H204N	119	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG	935
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCGCTGCTGCTGGGCACTGTC	936
anti-hHER2-HC-E357G-M358D-T359S-K360L-N361S-Q362W-V363L	120	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGG	937
		CAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCCTCCCGGGAGGGGGGC	938
anti-hHER2-HC-E388-GDSLWL-N389	126	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGAACAACCTACAAGACCACACCTCCAG	939
		CAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	940
anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	109	GCGACAGCCTGAGCTGGCTGCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC	941
		CAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCCACTGTCACCACGCTGGACAG	942
anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-Q196L-T197R-Y198L-1199L-C200N	111	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACGTGAACCACAAGCCCCA GCAAC	943
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCCACTGTCACCACGCTGGAC AG	944

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2- HC- L398G-D399-S400-D401L-G402S-S403W-F404L-LRLLN-F405	134	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTTCCTGTACAGCAAGCTGAC CGTG	945
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCCACTGGAGGTGTGGTCTTG TAG	946
anti-hHER2-HC- P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	110	CTGAGACTGCTGAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC	947
		GTTCAGCAGTCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGC	948
anti-hHER2-HC- P189D-S190-S191L-S192E-L193F-G194I-T195A-Q196S-T197K-Y198L-I199A	112	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAG	949
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACTGTCACCACGCTGGACA G	950
anti-hHER2-HC- S190G-S191D-S192-L193-G194S-T195W-Q196L-T197LRLLN-Y198	113	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTACATCTGCAACGTGAACCA CAAGC	951
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCGGGCACTGTCACCACGCTG G	952
anti-hHER2-HC- S190D-S191-S192L-L193EG194F-T195I-Q196AT197S-Y198K-I199L-C200A	115	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACGTGAACCACAAGCCCA GCAAC	953
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTGCGGGCACTGTCACCACGCTG G	954
anti-hHER2-HC- D413-K414S-S415L-R416S-W417-Q418L-Q419L-G420R-N421L-V422L	137	AGCCTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGC ACG	955
		CAGCAGTCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCCACGGTCAGCTTGCTG TAC	956
anti-hHER2-HC- D413-K414S-S415L-R416E-W417F-Q418I-Q419A-G420S-N421K-V422L	138	AGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGC ACG	957
		CAGCTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACGGTCAGCTTGCTGT AC	958
anti-hHER2-HC- E382D-S383-N384L-G385E-	125	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAACAACCTACAAGACCACACCTCCAG	959
		GGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCACTCCACGGCGATGTGCGC	960

ES 2 703 540 T3

Nombre secuencia	de	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
Q386F-P387I- E388A				
anti-hHER2-HC- E382D-S383- N384L-G385S- Q386W-P387L- E388L	124		GACAGCCTGAGCTGGCTGCTGAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	961
			CAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCCCACTCCACGGCGATGTTCGC	962
anti-hHER2-HC-V2- GDSLWLLRLLN- Q3	94		CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGCTGGTGGAGTCTGGCG G	963
			TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCAACCTCAGCAGTGGCACCG GG	964
anti-hHER2-LC-I2- GDSLWLLRLLN- Q3	26		CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGATGACCCAGTCCCCGA GC	965
			TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCGATATCAGCAGTGGCACCG GG	1095
anti-hHER2-LC- C214- GDSLWLLRLLN	28		CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACTAGACACCTCAGACAATCAA CC	966
			TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCGCACTCGCCCCTGTTGAAG C	967
anti-hHER2-LC-I2- DSLEFIASKLA-Q3	27		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGATGACCCAGTCCCCGA G	968
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTGCGATATCAGCAGTGGCACCG GG	969
anti-hHER2-LC- C214- DSLEFIASKLA	29		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTAATCTAGACACCTCAGACAATCAAC C	970
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTGCGCACTCGCCCCTGTTGAAG C	971
anti-hHER2-HC-V2- DSLEFIASKLA-Q3	95		CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGCTGGTGGAGTCTGGCG G	972
			CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCAACCTCAGCAGTGGCACCG G	973
	140			974

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-K447-GDSLWLLRLLN		CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTAATCTAGACACCTCAGACAATCAA CC	
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCCGGGGGACAGGCTC	975
anti-hHER2-HC-K447-DSLEFIASKLA	141	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTAATCTAGACACCTCAGACAATCAAC C	976
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGCCGGGGGACAGGCTC	977
anti-hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A	102	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCTGCCTGGTGAAGGACT AC	978
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGGGCCAGGGGG	979
anti-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193EG194F-T195I-Q196AT197S-Y198K-I199L	114	AGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGTGCAACGTGAACCACAAGC CCAG	980
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCACTGTCACCACGCTG G	981
anti-hHER2-HC-S191D-S192-L193-G194E-T195F-Q196I-T197A-Y198SI199K	116	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGTGCAACGTGAACCACAAGC CCAG	982
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGCACTGTCACCACG C	983
anti-hHER2-HC-L398D-D399S-S400L-D401EG402F-S403I-F404A-F405S-L406K-Y407L-S408A	135	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAG	984
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACTGGAGGTGTGGTCTTGT AG	985
anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASK-N389	131	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGAACAACCTACAAGACCACACC TCCAG	986
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	987
anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	130	AGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGAACAACCTACAAGACCACACC TCCAG	988
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	989

ES 2 703 540 T3

Nombre secuencia	de	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
pET22b/TEV			GAGAACCTGTACTTCCAAGGCCAC	990
			ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTTC	991
			CACCACCACCACCACCACTGAG	992
PPTasa_C.			TTGGAAGTACAGGTTCTCACGTTCCGAGAGGAATTTACACACTTC	993
thermocellum_pET2 2b/T EV			TAAGAAGGAGATATACATATGGGTTTTCTGCCGAAAGAGAAAAAG	994
ACP_C. thermocellum			GTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTATTATTTTAAATATATTCAACGACGTC GC	995
_pET22b			TAAGAAGGAGATATACATATGTTTCGAGAAAGTCCGTAAAATCATTGC	996
ACP_E.coli_pET22 b			GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGCTGGTGGCCGTTGATGTAATC	997
			TAAGAAGGAGATATACATATGAGCACTATCGAAGAACGCGTTAAG	998
anti-hHER2-HC- E388- GDSLDMLEWSLM- N389	132		CTGGACATGCTGGAGTGGAGCCTGATGAACAACACTACAAGACCACACC TCCAG	999
			CCACTCCAGCATGTCCAGGCTGTGCGCCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	1000
anti-hHER2-HC-V2- GDSLDM LEWSLM- Q3	96		CTGGACATGCTGGAGTGGAGCCTGATGCAGCTGGTGGAGTCTGGCG G	1001
			CCACTCCAGCATGTCCAGGCTGTGCGCCAACCTCAGCAGTGGCACCG G	1002
mAb2-HC-T359- GDSLWLLRLLN- K360	148		CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGAACCAGGTCAGCCTGA CCTG	1003
			TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCGGTCATCTCCTCCCGGGAT G	1004
mAb2-HC-E388- GDSLWLLRLLN- N389	149		CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACAACACTACAAGACCACGCC TCCC	1005
			TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCCTCCGGCTGCCATTGCTC TC	1006
anti-hHER2-HC- Y296- GDSLWLLRLLN- N297	143		CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACAGCACCTACAGGGTGG TGTC	1007
			TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTGCGCCGTAAGTCTCCTCTCTGGGCT TG	1096

ES 2 703 540 T3

Nombre de secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-N297-GDSLWLLRLLN-S298	145	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCC	1008
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGTACTGCTCCTCTCTGGGC	1097
anti-hHER2-HC-Y296-DSLEFIASKLAN297	144	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACAGCACCTACAGGGTGGTGTC	1009
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTAAGTCTCTCTCTGGGCTTG	1098
anti-hHER2-HC-N297-DSLEFIASKLAS298	146	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCACCTACAGGGTGGTGTCC	1010
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGTACTGCTCCTCTCTGGGC	1099
Tras_HC_S6_i415_S418A		GCCCGAGGGCGACGCCCTGAGCTGGCTG	1011
		CAGCCAGCTCAGGGCGTCGCCCTCGGGC	1100
Human PPTasa_N-His6 (clonación PIPE) ('His6' divulgada como SEQ ID NO: 1106)		CATCACCATCACCATCACGTTTTCCCTGCCAAACGGTTCTGC	1012
		ACGGGCCCTCTAGACTTATGACTTTGTACCATTTCTGATTGGAATTC	1101
pRS_N-His6 (clonación PIPE) ('His6' divulgada como SEQ ID NO: 1106)		TAAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACC	1013
		GTGATGGTGATGGTGATGAGGCTGAGCAGTGGCACCGG	1102
Human PPTasa_C-His6 (clonación PIPE) ('His6' divulgada como SEQ ID NO: 1106)		GGTGCCACTGCTCAGCCTGTTTTCCCTGCCAAACGGTTCTGC	1014
		GTGATGGTGATGGTGATGTGACTTTGTACCATTTCTGATTGGAATTC	1103
pRS_C-His6 (clonación PIPE) ('His6' divulgada como SEQ ID NO: 1106)		CATCACCATCACCATCACTAAGTCTAG	1015
		AGGCTGAGCAGTGGCACCGG	1104
T. maritima PPTasa		ATGATAGTCGGTGTGGGTATTGATG	1016
		TTACTCTCCGATGAGGATGTTACC	1105
Superi = Cebador de avance			
Inferior = Cebador reverso			

Tabla 9. Rendimientos de expresión de IgG de Trastuzumab con etiquetas peptídicas insertadas/injertadas (HC, cadena pesada; LC, cadena ligera). Los valores entre paréntesis, () [], corresponden a los rendimientos de anticuerpos después del escalamiento.

Construido (anticuerpo completo probado, el nombre representa parte la HC o LC que contiene la etiqueta peptídica, el tipo de cadena silvestre apareada no está en la lista)	Rendimiento por litro de cultivo/mg	Escala de expresión/L	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L	26	0.02	105
anti-hHER2-HC-L193G-G194D-T195S-Q196L-T197S-Y198W-I199L	73	0.02	117
anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	61 (36)	0.02 (1)	109
anti-hHER2-HC-T359G-K360D-N361S-Q362L-V363S-S364W	43	0.02	123
anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360	45 (29)	0.02 (1)	121
mAb2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360	78	0.05	148
mAb2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	26	0.05	149
anti-hHER2-HC-E357G-M358D-T359S-K360L-N361S-Q362W-V363L	59	0.02	120
anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	39 (13) [16]	0.02 (1) [0.5]	127
anti-hHER2-HC-E388-GDSLWL-N389	39	0.02	126
anti-hHER2-LC-C214-GDSLWLLRLLN	42	0.02	28
anti-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L-LRLLN-A141	2	0.05	106
anti-hHER2-HC-K133G-S134D-T135S-S136L-G137S-G138W-LLRLLN-T139	19	0.05	103
anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	48	0.3	110
anti-hHER2-HC-S190G-S191D-S192-L193-G194S-T195W-Q196L-T197L-RLLN-Y198	33	0.05	113
anti-hHER2-HC-V2-GDSLWLLRLLN-Q3	20(11)	0.05 (0.5)	94
anti-hHER2-LC-I2-GDSLWLLRLLN-Q3	3	0.05	26
anti-hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3	43 (29)	0.05 (0.4)	27
anti-hHER2-LC-C214-DSLEFIASKLA	55	0.05	29
anti-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	34 (20)	0.05 (0.4)	95

ES 2 703 540 T3

Construido (anticuerpo completo probado, el nombre representa parte la HC o LC que contiene la etiqueta peptídica, el tipo de cadena silvestre apareada no está en la lista)	Rendimiento por litro de cultivo/mg	Escala de expresión/L	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-K447-DSLEFIASKLA	32	0.05	141
anti-hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A	32	0.05	102
anti-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L	41	0.05	114
anti-hHER2-HC-S191D-S192-L193-G194E-T195F-Q196I-T197A-Y198S-I199K	30	0.05	116
anti-hHER2-HC-L398D-D399S-S400L-D401E-G402F-S403I-F404A-F405S-L406K-Y407L-S408A	13	0.05	135
anti-hHER2-HC-Y296-GDSLSWLLRLLN-N297	23	0.05	143
anti-hHER2-HC-N297-GDSLSWLLRLLN-S298	23	0.05	145
anti-hHER2-HC-Y296-DSLEFIASKLA-N297	21	0.05	144
anti-hHER2-HC-N297-DSLEFIASKLA-S298	23	0.05	146
anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	36(15)	0.05 (0.5)	129
anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	35 (20)	0.05 (0.5)	130
anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASK-N389	56	0.05	131
anti-hHER2-HC-T359-DSLEFIASKLA-K360	43 (18)	0.05 (0.5)	122
anti-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L-C200A	19	0.05	115
anti-hHER2-HC-P189D-S190-S191L-S192E-L193F-G194I-T195A-Q196S-T197K-Y198L-I199A	40	0.05	112
anti-hHER2-HC-D413-K414S-S415L-R416E-W417F-Q418I-Q419A-G420S-N421K-V422L	29	0.05	138
anti-hHER2-HC-E382D-S383-N384L-G385E-Q386F-P387I-E388A	39	0.05	125
anti-hHER2-HC-E382D-S383-N384L-G385S-Q386W-P387L-E388L	33	0.05	124
anti-hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79	13	0.05	30
anti-hHER2-HC-S63-LEFIASK-V64	12	0.05	97
anti-hHER2-HC-V64L-EFIAS-K65	23	0.05	98

Construido (anticuerpo completo probado, el nombre representa parte la HC o LC que contiene la etiqueta peptídica, el tipo de cadena silvestre apareada no está en la lista)	Rendimiento por litro de cultivo/mg	Escala de expresión/L	SEQ ID NO
anti-hHER2-HC-V64L-EFIASKLA-K65	11	0.05	99
anti-hHER2-HC-V2-GDSLWLLRLLN-Q3-E388-DSLEFIASKLA-N389	8 (19)	0.05 (0.4)	142
anti-hHER2-HC-V2-GDSLDMLEWSLM-Q3	56	0.05	96
anti-hHER2-HC-E388-GDSLDMLEWSLM-N389	32	0.05	132

Ejemplo 3. Producción de Sfp 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa)

La PPTasa de *B. subtilis* Sfp se clonó en el vector de expresión pET22b utilizando el método PIPE (véase Klock et al., *Proteins* 71: 982-994 (2008)). Para permitir la escisión de la etiqueta His₆ C-terminal (SEQ ID NO: 1106), se insertó un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV (virus de ataque al tabaco) corriente abajo de la secuencia de codificación Sfp. Todos los cebadores utilizados para la clonación se enumeran en la Tabla 8.

La expresión y la purificación de proteínas se realizaron de acuerdo con Yin et al. (véase *Nat. Protoc.* 1: 280-285 (2006)) con algunas modificaciones menores. En primer lugar, se inoculó un cultivo iniciador LB de 5 mL a partir de la reserva en glicerol de células de *E. coli* BL21 (DE3) que albergaba el plásmido de expresión pET22b/sfp. El cultivo se hizo crecer hasta saturación mediante incubación durante la noche a 37°C a 300 rpm. Al día siguiente, se usó el cultivo iniciador para inocular 1 L de medio TB (Sigma), que se agitó a 300 rpm y se mantuvo a 37°C. Después de alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm, el cultivo se indujo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM y la temperatura se redujo a 30°C. El cultivo se agitó durante otras 12-16 horas y las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación. Antes de su uso, el sedimento celular se almacenó a -20°C.

Para iniciar la purificación de proteínas, el sedimento congelado se descongeló durante 15 minutos en hielo y se resuspendió en un regulador que contenía Tris/HCl 20 mM (pH 7.9), NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM y 2 U/mL de DNasa I (3 mL de regulador por g de peso húmedo de células). La lisis celular se indujo por sonicación durante 4 minutos, con intervalos de 0.5 segundos y de 0.5 segundos. Con el fin de eliminar los residuos celulares insolubles, el lisado resultante se centrifugó a 40.000 x g durante 20 minutos a 4°C. La enzima Sfp marcada con His₆ ('His₆' descrita como SEQ ID NO: 1106) se capturó luego mediante la adición de 4 mL de una suspensión de Ni-NTA al 50% (Qiagen) al lisado aclarado. Después de agitar durante 1 hora a 4°C, la mezcla de resina-lisado se vertió en una columna desechable (Bio-Rad). La resina sedimentada se lavó con 25 volúmenes de columna de NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM (pH 8.0) y se eluyó con 5 volúmenes de columna de NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM (pH 8.0). La enzima Sfp purificada se dializó luego dos veces contra Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10% (pH 7.5) utilizando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer (Pierce) con un corte de 3.5 kDa, y luego se concentró a una concentración final de al menos 100 µM usando una unidad de filtro centrífugo Amicon Ultra-15 (Millipore) con un corte de 10 kDa. Finalmente, la enzima concentrada se dividió en alícuotas, se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

Con el fin de mejorar la pureza de Sfp usando cromatografía inversa de Ni-NTA, se introdujo un sitio de escisión de TEV antes de la etiqueta His₆ C-terminal (SEQ ID NO: 1106). La purificación de Ni-NTA de este constructo se realizó como se describe anteriormente. Sin embargo, después de la elución, la enzima Sfp se intercambió en un regulador de escisión de TEV que contenía Tris/HCl 50 mM, NaCl 50 mM (pH 8.0). La eliminación de la etiqueta His₆ (SEQ ID NO: 1106) se llevó a cabo mediante digestión con proteasa TEV al 7% (p/p) a 23°C durante 1 hora y luego a 4°C durante 16 horas. La enzima Sfp digerida con TEV se volvió a cargar en una columna de Ni-NTA equilibrada con 1 x PBS (pH 7.2). La enzima escindida se recogió del flujo de la columna y de una etapa de lavado que involucró 5 volúmenes de columna de NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM (pH 8.0). La enzima Sfp purificada se dializó luego dos veces contra Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10% (pH 7.5) utilizando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer (Pierce) con un corte de 3.5 kDa. Después de la diálisis, Sfp se concentró hasta una concentración final de al menos 100 µM utilizando una unidad de filtro centrífugo Amicon Ultra-15 (Millipore) con un corte de 10 kDa. Finalmente, la enzima concentrada se dividió en alícuotas, se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

La pureza de Sfp se evaluó mediante SDS-PAGE. La eliminación de la etiqueta His₆ (SEQ ID NO: 1106) se verificó mediante LC-MS y el rendimiento de Sfp se cuantificó mediante espectroscopía ultravioleta a 280 nm (Espectrofotómetro ND-1000 UV-Vis, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) utilizando un coeficiente de extinción molar de 28620 M⁻¹cm⁻¹. Se obtuvieron 48 mg de enzima Sfp escindida con TEV por litro de cultivo.

Ejemplo 4. Identificación y producción de homólogos y mutantes de PPTasa.**Mutante R4-4 de Sfp**

Utilizando métodos estándar de biología molecular, insertamos las siguientes mutaciones en la PPTasa Sfp de *B. subtilis*: Lys28Glu, Thr44Glu y Cys77Tyr. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de mutagénesis se enumeran en la Tabla 8.

Para la expresión de proteínas, se inocularon 0.5 L de medio TB con un cultivo iniciador de 5 mL. El cultivo se agitó a 300 rpm y se mantuvo a 37°C. Después de alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm, el cultivo se indujo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM y la temperatura se redujo a 30°C. El cultivo se agitó durante otras 16 horas a 300 rpm y las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación (15 min a 3400 rpm). Antes de su uso, el sedimento celular se almacenó a -20°C.

La pella congelada se descongeló durante 10 minutos en hielo y se resuspendió en un regulador que contenía Tris/HCl 50 mM (pH 8), NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, 1 U/mL DNasa I y EDTA completo™ -comprimidos de cóctel inhibidores de la proteasa (Roche) (3 mL de regulador por g de peso húmedo de células). La lisis celular se indujo por sonicación durante 3 minutos en hielo, con intervalos de 0.5 segundos encendida y 0.5 segundos apagada. Después de la incubación durante otros 10 minutos en hielo, el lisado se centrifugó a 40.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El mutante Sfp R4-4 marcado con His₆ ('His₆' descrito como SEQ ID NO: 1106) se capturó luego mediante la adición de 2 mL de una suspensión de Ni-NTA al 50% (Qiagen) al lisado aclarado. Después de agitar durante 1 hora a 4°C, la mezcla de resina-lisado se vertió en una columna desechable (Bio-Rad). Se recogió el flujo y la resina sedimentada se lavó con 50 volúmenes de columna de Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM (pH 8.0) y se eluyó con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM (pH 8.0). Después de cambiar el regulador del eluido en regulador de escisión de proteasa TEV que contiene Tris/HCl 50 mM, NaCl 50 mM (pH 8.0) usando una columna PD-10, la eliminación de la etiqueta His₆ (SEQ ID NO: 1106) se llevó a cabo mediante digestión con 7% (p/p) proteasa TEV a 23°C durante 1 hora y luego a 4°C durante 16 horas.

El mutante Sfp R4-4 digerido con TEV se volvió a cargar luego en una columna de Ni-NTA (1 mL de volumen de lecho), que se equilibró con 1 x PBS (pH 7.2). La enzima escindida se recogió del flujo de la columna y de una etapa de lavado con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM (pH 8.0). El mutante Sfp R4-4 purificado se intercambió luego con regulador contra Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10% (pH 7.5) usando columnas PD-10. Según el ensayo de Bradford que utiliza BSA como estándar, la enzima tenía una concentración final de 3.1 mg/mL a un volumen final de 17 mL, que corresponde a 105 mg de mutante R4-4 escindido con TEV por litro de cultivo. Finalmente, la enzima se dividió en partes alícuotas en fracciones de 100 a 1000 µL, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. La pureza de la enzima se evaluó mediante análisis SDS-PAGE y la eliminación de la etiqueta His₆ (SEQ ID NO: 1106) se verificó mediante ESI-MS.

AcpS

Usando métodos de biología molecular estándar, se clonó el gen *acpS* de *E. coli* K-12 en un vector pET22b que permite la expresión de la enzima recombinante con una etiqueta His₆ C-terminal (SEQ ID NO: 1106). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la clonación se enumeran en la Tabla 8.

Después de la inoculación de un cultivo iniciador saturado de 5 mL, la enzima AcpS se expresó en 1 L de medio TB. Después de agitar el cultivo a 37°C con 300 rpm, se indujo la producción de proteínas mediante la adición de IPTG 1 mM a una densidad óptica de 0.5 (600 nm). La expresión de la proteína se llevó a cabo durante la noche a 30°C y 300 rpm. Al día siguiente, las células se recogieron mediante centrifugación a 3400 rpm durante 15 min. El sedimento celular se almacenó a -20°C antes de la purificación de proteínas.

Para iniciar la purificación de proteínas, el sedimento congelado se descongeló durante 10 minutos en hielo y se resuspendió en regulador (3 mL de regulador por g de peso húmedo de células) que contenía Tris/HCl 50 mM (pH 8), NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, 1 U/mL DNasa I, y tabletas de cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA™ completas (Roche). La lisis celular se logró sometiendo a sonicación la suspensión celular en hielo durante 3 minutos con intervalos de 0.5 segundos y 0.5 segundos. Después de otro período de incubación de 10 minutos en hielo, el lisado se centrifugó a 40.000 g durante 30 minutos a 4°C. Luego se agregaron 2 mL de una suspensión de Ni-NTA al 50% al lisado aclarado y la mezcla de lisado/resina se agitó durante 1 hora a 4°C. La mezcla de lisado/resina se vertió en una columna desechable. Después de recoger el flujo, la columna de Ni-NTA se lavó con 50 volúmenes de columna de regulador que contenía Tris 50 mM (pH 8), NaCl 300 mM e imidazol 20 mM. La elución se realizó con 5 volúmenes de columna de regulador que contenía Tris 50 mM (pH 8), NaCl 300 mM e imidazol 250 mM. Usando un casete de diálisis de corte de 3.5 kDa (Slide-A-Lyzer, Thermo Scientific), el eluido se dializó durante la noche en un regulador que contenía Tris 50 mM (pH 8) y NaCl 300 mM. La proteína precipitada se eliminó utilizando un filtro de 0.45 µm (Millipore). Después de la adición de glicerol a una concentración final del 10% (v/v), la proteína purificada con Ni-NTA se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C (100 y 200 µL de alícuotas). La pureza de AcpS se evaluó mediante SDS-PAGE y el rendimiento se cuantificó mediante el ensayo de Bradford utilizando BSA como estándar. Se obtuvieron aproximadamente 13 mg de enzima AcpS por litro de cultivo.

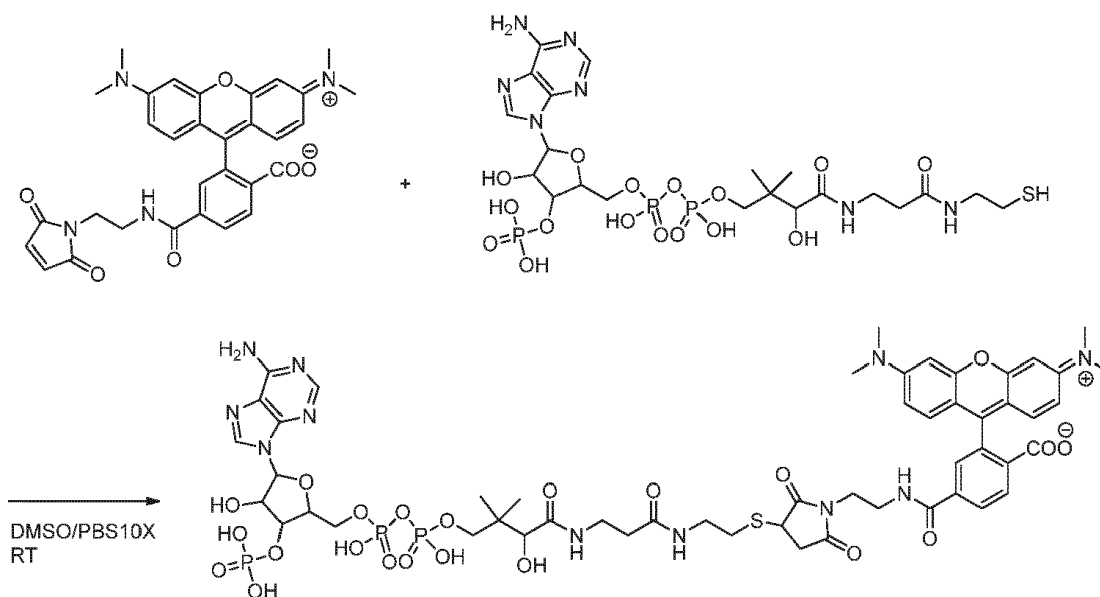
T. maritima PPTasa

La expresión de *T. maritima* PPTasa se llevó a cabo a una escala de 1 L en medio FM nativo mediante inoculación con un cultivo iniciador saturado de 10 mL. El cultivo de 1 L se agitó a 300 rpm a una temperatura de 37°C. Después de 2.5 horas, el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. La producción de proteína se indujo mediante la adición de arabinosa a una concentración final de 0.1% (p/v) y el cultivo se agitó durante 4 horas adicionales. Las células se recogieron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos y los sedimentos celulares se almacenaron a -20°C. La purificación inicial de *T. maritima* PPTasa se realizó mediante IMAC (cromatografía de afinidad de metales inmovilizados) utilizando resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen). Los sedimentos celulares se descongelaron y se resuspendieron en 60 mL de regulador de lisis (regulador Tris 40 mM (pH 8.0), NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, TCEP 1 mM). La suspensión celular se sometió a sonicación en hielo durante 1.5 minutos (usando pulsos de 1 segundo) y se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos a 5°C. El lisado aclarado se cargó en una columna de Ni-NTA de 1.5 mL. Después de recoger el flujo, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de regulador de lavado (regulador Tris 40 mM (pH 8.0), NaCl 300 mM, imidazol 40 mM, glicerol al 10%, TCEP 1 mM). La elución de la proteína se llevó a cabo con 2 volúmenes de columna de regulador de elución (regulador Tris 20 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM, imidazol 300 mM, TCEP 1 mM).

El eluido de Ni-NTA se purificó adicionalmente utilizando una columna Superdex 75 (GE Healthcare) conectada a un sistema Äkta FPLC. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se realizó a una tasa de flujo de 1 mL/min en regulador Tris 10 mM (pH 7.4) complementado con EDTA 1 mM y glicerol al 10% (v/v). Después de analizar las fracciones que contenían proteínas mediante SDS-PAGE, las fracciones que contenían la PPTasa de *T. maritima* se agruparon y se dializaron nuevamente contra el regulador usado previamente para la SEC. La enzima purificada se concentró luego utilizando una unidad de filtro centrífugo Amicon Ultra-15 (Millipore) con un corte de 10 kDa. El precipitado se eliminó mediante centrifugación a 13000 rpm durante 2 minutos utilizando una centrífuga de mesa. La proteína concentrada (1.0 mg/mL, 48 µM) se dividió en partes alícuotas en fracciones de 100 µL, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a menos 80°C. La pureza de la PPTasa de *T. maritima* se evaluó mediante SDS-PAGE y el rendimiento se cuantificó mediante el ensayo de Bradford utilizando BSA como estándar. Después de todas las etapas de purificación, se obtuvieron 1.4 mg de enzima AcpS por litro de cultivo.

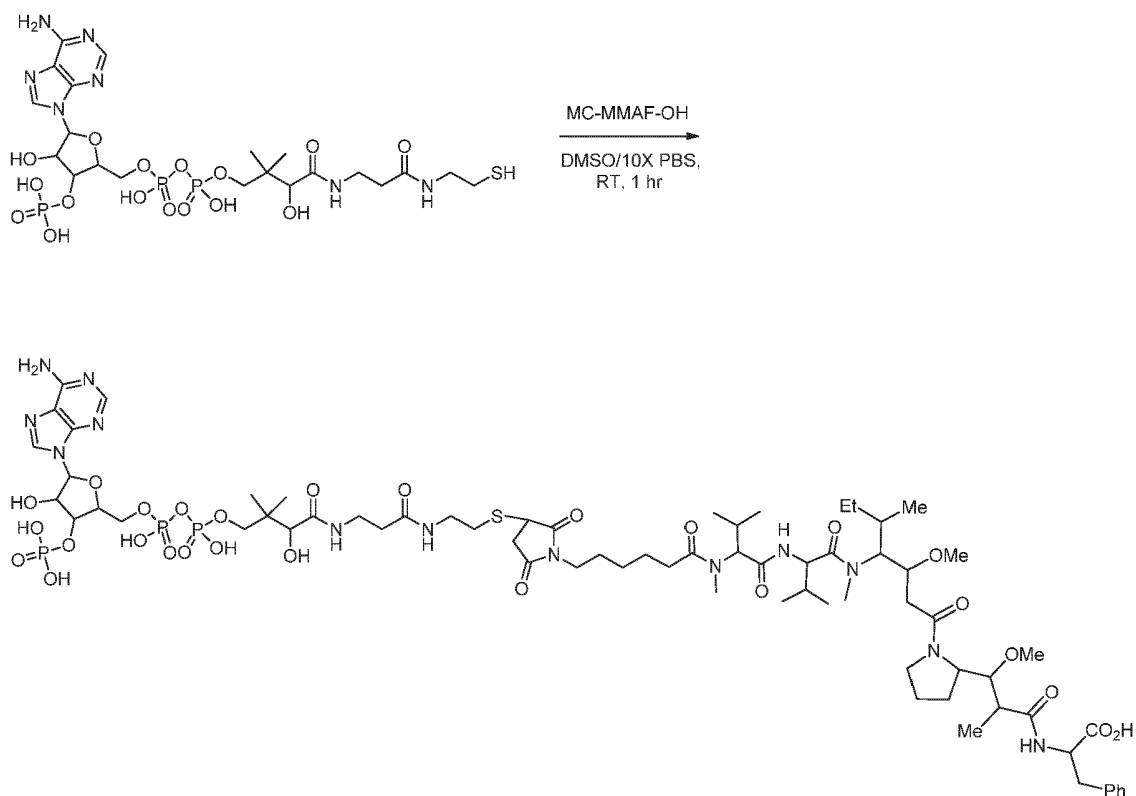
Ejemplo 5. Síntesis de los análogos de coenzima A (CoA)

CoA-maleimidoetilamido-tetrametilrodamina



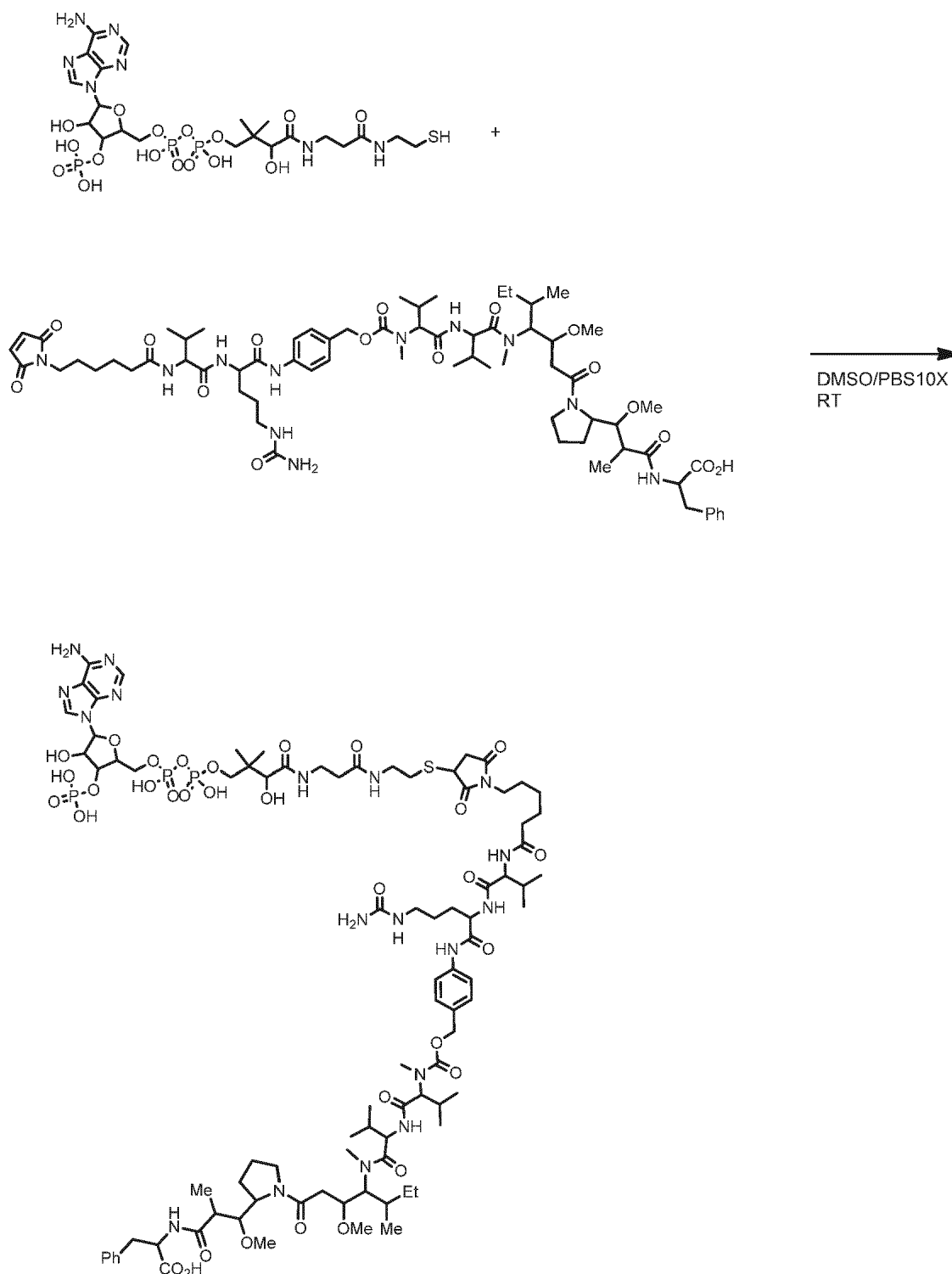
Se añadió tetrametilrodamina-C2-maleimida (5.5 mg, 10.4 µmol) disuelta en 300 µL de DMSO a CoA (10.4 µmol en 150 µL de agua) en 750 µL de regulador PBS 10x y se agitó a 23°C durante 1 hora. Después de la reacción, la mezcla de reacción se liofilizó para obtener el producto crudo, que se purificó por cromatografía ultrarrápida RP-C18. Las fracciones del producto deseado se combinaron y se liofilizaron para proporcionar CoA-maleimidoetilamido-tetrametilrodamina (9.8 mg con 94.4% de pureza) en forma de un polvo púrpura oscuro. ESI-MS calculada para $C_{52}H_{64}N_{11}O_{22}P_3S$ [MH]⁺: 1320.3; observado: 1320.3.

CoA-maleimidocaproil (MC)-MMAF



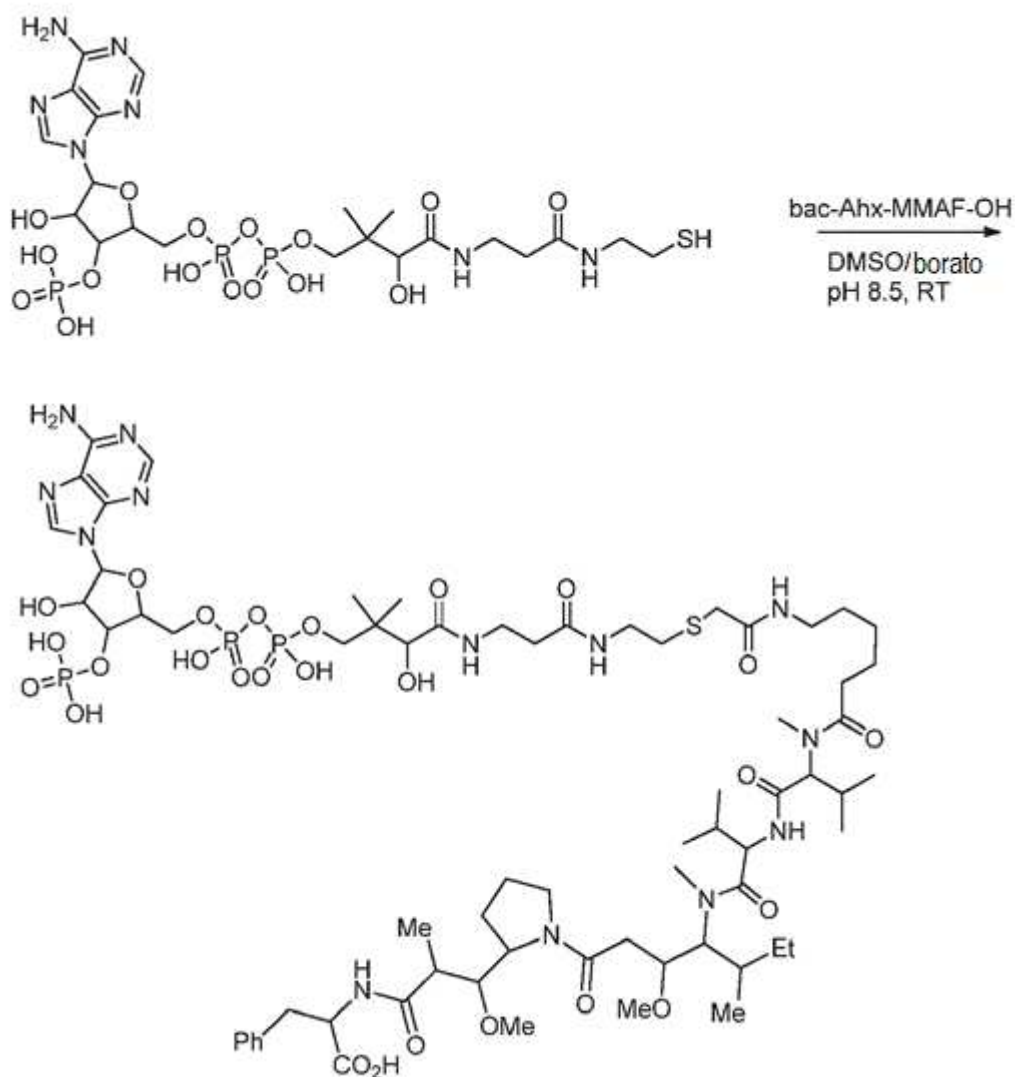
MC-MMAF (véase Doronina et al., Bioconj. Chem. 17: 114-124 (2006)) (36.0 mg, 38.9 μ mol) disuelto en 1.8 mL de DMSO fue agregado a CoA (39.0 μ mol en 312 μ L de agua) en 2.9 mL de regulador PBS 10x y se agitó a 23°C durante 1 hora. Después de la reacción, la mezcla de reacción se liofilizó para obtener el material crudo, que se purificó por cromatografía ultrarrápida RP-C18. Las fracciones del producto deseado se combinaron y se liofilizaron para proporcionar CoA-MC-MMAF (35.5 mg con 97.5% de pureza) como un polvo blanco. ESI-MS calculada para $C_{70}H_{112}N_{13}O_{27}P_3S$ $[MH]^+$: 1691.7; observado: 1691.2.

CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAF



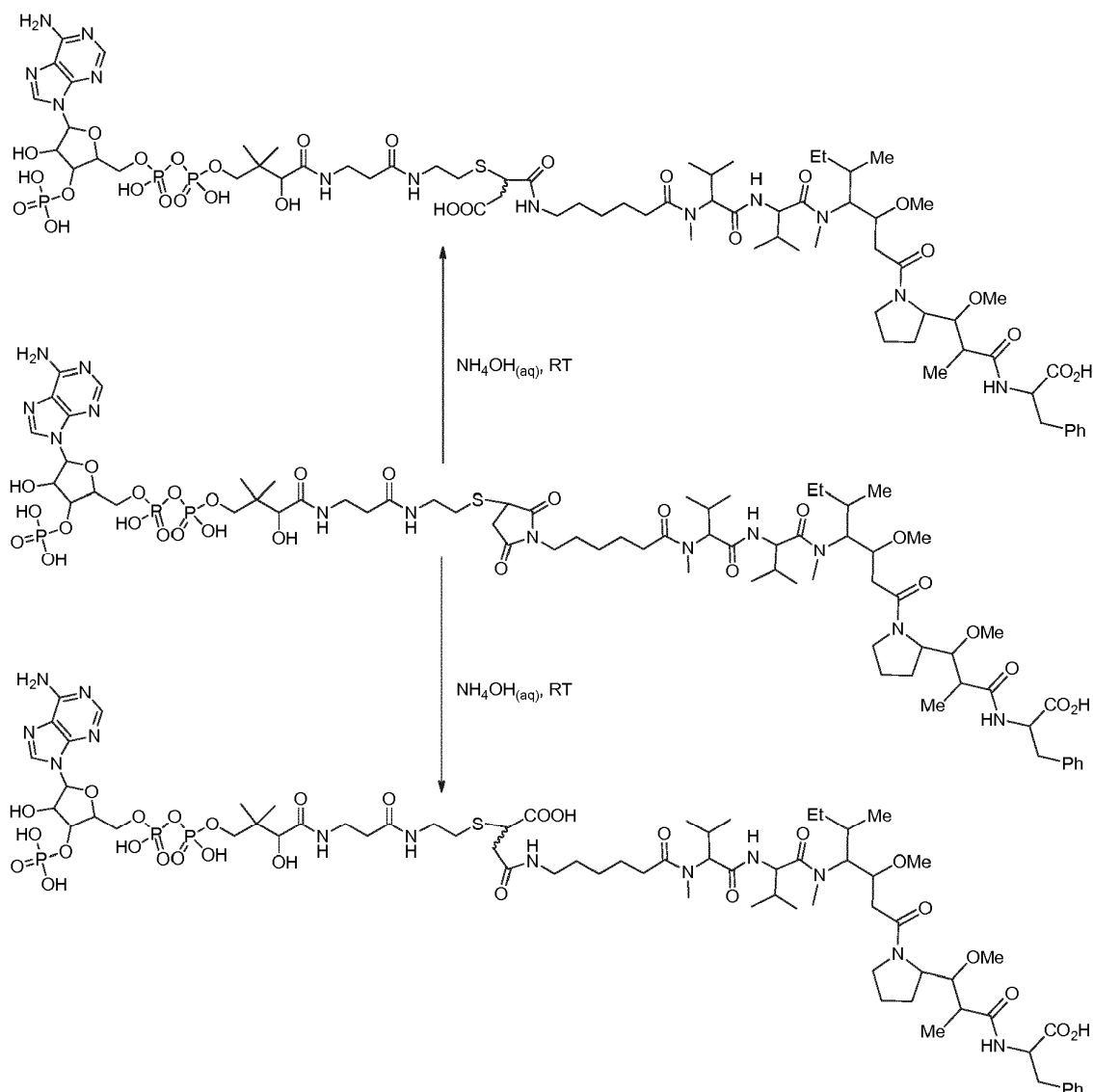
- 5 Se añadió MC-Val-Cit-PABC-MMAF (véase Doronina et al., Bioconj. Chem. 17: 114-124 (2006)) (5.7 mg, 4.3 μ mol) disuelto en 300 μ L de DMSO a CoA (4.3 μ mol en 34 μ L de agua) en 2666 μ L de regulador PBS 10x y se agitó a 23°C durante 1 hora. Después de la reacción, la mezcla de reacción se liofilizó para obtener el material crudo, que se purificó por cromatografía ultrarrápida RP-C18. Las fracciones del producto deseado se combinaron y se liofilizaron para proporcionar CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAF (6.1 mg con una pureza del 98.0%) como un polvo blanco. ESI-MS calculada para $C_{89}H_{139}N_{18}O_{32}P_3S$ $[MH_2]^{2+}/2$: 1049.4; observado: 1049.4.

CoA-Ac-Ahx-MMAF



- 5 Se añadió bromoacetil-Ahx-MMAF (véase, Alley et al., Bioconj. Chem. 19: 759-765 (2008)) (1.3 mg, 1.4 μ mol) disuelto en 400 μ L de DMSO a CoA (5.4 μ mol en 43 μ L de agua) en 3.6 mL de regulador borato (6.7 mM a pH 8.5) y se agitó a 23°C durante 24 horas. Después de la reacción, la mezcla de reacción se liofilizó para obtener el material crudo, que se purificó por cromatografía ultrarrápida RP-C18. Las fracciones del producto deseado se combinaron y se liofilizaron para proporcionar CoA-Ac-Ahx-MMAF (1.1 mg con una pureza del 96.9%) como un polvo blanco. ESI-MS calculada para C₆₈H₁₁₂N₁₃O₂₆P₃S [MH]⁺: 1651.7; observado: 1651.3.

CoA-anillo abierto-MC-MMAF



Se añadió CoA-MC-MMAF (5 μmol en 1 mL de agua) a 9 mL de NH_4OH 1 M (ac.) y se agitó a 23°C durante 30 minutos. Después de la reacción, la mezcla de reacción se liofilizó para obtener el material crudo, que se purificó por cromatografía ultrarrápida RP-C18. Las fracciones del producto deseado se combinaron y se liofilizaron para proporcionar 3.9 mg de CoA-MC-MMAF con anillo de maleimida como una mezcla de cuatro isómeros posicionales y diastereoméricos como se muestra en el esquema anterior (polvo blanco, 96.6% de pureza). ESI-MS calculada para $\text{C}_{70}\text{H}_{114}\text{N}_{13}\text{O}_{28}\text{P}_3\text{S}$ $[\text{MH}]^+$: 1709.7; observado: 1709.2.

Ejemplo 6. Marcación de IgG marcadas con péptidos con análogos de CoA *in vitro*

Para ejemplificar la conjugación de un solo paso de análogos de CoA a IgG marcadas con péptido *in vitro*, se hicieron reaccionar varios constructos de Trastuzumab marcados con péptido con CoA-MC-MMAF en presencia de la enzima Sfp. En general, las reacciones de conjugación se llevaron a cabo en HEPES 50 o 75 mM o regulador Tris, pH 7.5 u 8.0 complementado con 10.0 o 12.5 mM MgCl_2 . La concentración final de Trastuzumab marcado con péptido se mantuvo constante a 2.5 μM , lo que corresponde a 5.0 μM por etiqueta peptídica, mientras que la concentración final de los sustratos de CoA generalmente varió entre 40 μM y 100 μM . Para iniciar la reacción de conjugación, se añadió la enzima Sfp para dar una concentración final de típicamente 1 μM . La reacción enzimática se dejó proceder a 23°C o 37°C durante 16 horas. Después de este período de tiempo, el progreso de la reacción se analizó mediante ESI-MS y HPLC.

Ejemplo 7. Marcación de inserciones.

La conjugación casi cuantitativa de CoA-MC-MMAF a seis anticuerpos de Trastuzumab y un segundo anticuerpo ("mAb2") contra un objetivo diferente con etiquetas S6 o ybbR insertadas se realizó incubando mezclas de reacción con Sfp como se describe en el Ejemplo 6. Mezclas de reacción de conjugación de un solo paso (Tabla 10) de anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121, Figura 5A), anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-

N389 (SEQ ID NO: 127, Figura 5B), anti-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3 (SEQ ID NO: 95, Figura 5C), anti-hHER2-HC-V2-GDSLWLLRLLN-Q3 (SEQ ID NO: 94, Figura 5D), anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389 (SEQ ID NO: 130, Figura 5E), anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389 (SEQ ID NO: 129, Figura 5F), y mAb2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 148, Figura 5G) indican una conversión casi completa de los anticuerpos marcados en un inmunoconjugado con una relación aproximada de fármaco a anticuerpo (DAR) de 2. Las ESI-MS de muestras de conjugado reducido sugieren una modificación específica del sitio de solo la cadena pesada como se diseñó. Para anti-hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3 (SEQ ID NO: 27, Figura 5H), la HPLC sugiere que solo queda una formación parcial del inmunoconjugado ya que permanecen cantidades significativas de anticuerpo no modificado (39%, tiempo de retención de 4.8 min) y se observa una mezcla de DAR=1 (46%, tiempo de retención de 5.4 minutos) y DAR=2 (16%, tiempo de retención de 5.9 minutos).

Tabla 10. Análisis por MS y HPLC de las reacciones de conjugación con etiquetas insertadas:

SEQ ID NO	Construido de anticuerpo (anticuerpo completo probado, el nombre representa parte de HC o LC que contiene la etiqueta peptídica, la etiqueta tipo silvestre pareada no está en la lista)	Masa observada (Da)	Masa esperada inmunoconjugado (Da)	Masa esperada anticuerpo no modificado (Da)	DAR = 2 de acuerdo con HPLC
121	anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360	51785.20	51791	50525	92%
127	anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	51786.40	51791	50525	97%
95	anti-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	51588.00	51598	50332	96%
94	anti-hHER2-HC-V2-GDSLWLLRLLN-Q3	51780.40	51791	50525	100%
130	anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	51517.20	51527	50261	94%
129	anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	51588.00	51598	50332	100%
27	anti-hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3	25878.40	25884	24618	16%
148	mAb2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360	52848.80 (mayor); 51600.40 (menor)	52849	51597	95%

Como se muestra en la Figura 6, los inmunoconjugados de trastuzumab (A) anti-hHER2-HC-V2-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q3 (SEQ ID NO: 1120), (B) anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389 (SEQ ID NO: 1122) y (C) anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKL-N389 (SEQ ID NO: 1121) se analizaron mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (AnSEC) en una columna Shodex PROTEIN KW-803. En los tres casos, los ADC fueron monoméricos (no se detectaron cantidades de material agregado).

Ejemplo 8. Marcación de constructos con etiquetas de péptidos injertados

También se intentó la conjugación catalizada por Sfp *in vitro* de un solo paso de CoA-MC-MMAF con el anticuerpo Trastuzumab con una etiqueta ybbR injertada. La reacción catalizada por Sfp del constructo IgG1 anti-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L (SEQ ID NO: 114) se realizó como se describe en el Ejemplo 6. HPLC (Figura 7) y el análisis ESI-MS de la mezcla de reacción indica que no se formó el inmunoconjugado con MMAF (conjugado de masa esperada: 50489 Da, anticuerpo no modificado de masa esperada: 49223 Da, observado: 49216.8 Da). Otros constructos injertados tampoco reaccionaron y no se formaron inmunoconjugados.

Ejemplo 9. Marcación de constructos mixtos de injerto/inserción

También se intentó la conjugación catalizada por Sfp in vitro de CoA-MC-MMAF con anticuerpos de Trastuzumab con etiquetas S6 o ybbR injertadas/insertadas. Dos mutantes de Trastuzumab anti-hHER2-HC-V64L-EFIASKLA-K65 (SEQ ID NO: 99) y anti-hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79 (SEQ ID NO: 30) se hicieron reaccionar con CoA-MC-MMAF y Sfp como se describe en el Ejemplo 6. Mientras que el anti-hHER2-HC-V64L-EFIASKLA-K65 (SEQ ID NO: 99) se modifica parcialmente como lo indica la HPLC de la mezcla de reacción (Figura 8A), el anti-hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79 (SEQ ID NO: 30) (Figura 8B) no reaccionó en condiciones idénticas (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados de ESI-MS de las reacciones de conjugación con etiquetas injertadas/insertadas mezcladas:

SEQ ID NO	Constructo de anticuerpo (anticuerpo completo probado, el nombre representa parte de HC o LC que contiene la etiqueta peptídica, la etiqueta tipo silvestre pareada no está en la lista)	Masa observada (Da)	Masa esperada inmunoconjugado (Da)	Masa esperada anticuerpo no modificado (Da)	DAR = 2 de acuerdo con HPLC
99	anti-hHER2-HC-V64L-EFIASKLA-K65	51287.20	51297	50031	32%
30	anti-hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79	24324.80	25597	24331	0%

Ejemplo 10. Marcación con colorantes fluorescentes.

Para extender la marcación de anticuerpos enzimáticos más allá de la unión específica del sitio de las citotoxinas, demostramos la viabilidad de la catálisis por Sfp para generar conjugados de anticuerpo-fluoróforo. Este ejemplo representa dos conjugaciones catalizadas por Sfp de CoA-tetrametilrodamina (CoA-TMR) con los anticuerpos de Trastuzumab con etiquetas S6 injertadas o insertadas realizadas como se describe en el Ejemplo 6. Las señales de HPLC de las mezclas de reacción se monitorizaron a 280 nm y 555 nm (Figura 9). La última longitud de onda está cerca del máximo de absorción del colorante TMR (-550 nm). Además, los datos de los espectros de masas desconvolucionados de los conjugados anticuerpo-fluoróforo se resumen en la Tabla 12.

Para el anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L (SEQ ID NO: 109) que contiene una etiqueta S6 injertada truncada, la conjugación resultó principalmente en la formación de un colorante por conjugado de anticuerpo (Figura 9A). Del mismo modo, el anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121) con una etiqueta S6 de longitud completa insertada entre el residuo T359 y K360 mostró predominantemente la conjugación de dos moléculas de colorante a cada anticuerpo (Figura 9B). Los resultados ilustran que las etiquetas S6 pueden usarse para la conjugación de marcación fluorescente de anticuerpos modificados.

Tabla 12. Resultados de ESI-MS de las reacciones de conjugación con un colorante fluorescente:

SEQ ID NO	Constructo de anticuerpo (anticuerpo completo probado, el nombre representa parte de HC o LC que contiene la etiqueta peptídica, la etiqueta tipo silvestre pareada no está en la lista)	Masa observada (Da)	Masa esperada inmunoconjugado (Da)	Masa esperada anticuerpo no modificado (Da)
109	anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	50177.20	50180	49286
121	anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360	51422.00	51419	50525

Ejemplo 11. Marcación casi cuantitativa con citotoxinas unidas a través de un enlace tioéter o maleimida hidrolizada

Aunque no se observa para los conjugados de la invención, la carga útil ligada a maleimida puede sufrir desconjugación en plasma mediante intercambio de maleimida con tioles reactivos de albúmina, glutatión y cisteína (Alley et al., Bioconjugate Chem. 2008, 19, 759-765). Los conjugados basados en maleimida se pueden estabilizar a través de la apertura química del anillo del enlace maleimidocaproilo (véase, Shen et al., Nature Biotech. 30: 184-189 (2012)). Para probar este procedimiento de hidrólisis, se preparó el respectivo ADC de anti-hHER2-HC-T359-

- 5 GDSLSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121) utilizando CoA-anillo abierto-MC-MMAF. Además, para probar químicas reactivas al tiol alternativas, se unió la citotoxina MMAF al tiol terminal de CoA a través de un enlace tioéter a base de acetamida que resulta en CoA-Ac-Ahx-MMAF (véase, Alley et al., Bioconj. Chem. 19: 759-765 (2008)). Los resultados de ESI-MS y HPLC de estas reacciones de conjugación enzimática (según el protocolo descrito en el Ejemplo 6) se resumen en la Tabla 13. Se observó un marcado casi cuantitativo con DAR = 2 para anti-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121) reaccionó con CoA-anillo abierto-MC-MMAF (Figura 10A) y anti-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121) reaccionó con CoA-Ac-Ahx-MC-MMAF (Figura 10B).

Tabla 13. Resultados de ESI-MS de las reacciones de conjugación con enlazadores alternativos:

SEQ ID NO del constructo de anticuerpo (anticuerpo completo probado, el nombre representa parte de HC o LC que contiene la etiqueta peptídica, la etiqueta tipo silvestre pareada no está en la lista)	Sustrato de CoA	Masa observada (Da)	Masa esperada inmuconjugado (Da)	Masa esperada anticuerpo no modificado (Da)	DAR = 2 de acuerdo con HPLC
121	maleimida-anillo abierto CoA-MC-MMAF	51802.00	51809	50525	85%
121	CoA-Ac-Ahx-MMAF	51742.40	51750	50525	80%

10 Ejemplo 12. Marcación casi cuantitativa con citotoxina con enlazador escindible

- Para demostrar la marcación de las IgG marcadas con péptidos con citotoxinas que se unen a través de enlazadores escindibles, se conjugó CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAF que contiene el enlazador de valina-citrulina sensible a la catepsina B con cualquier enlazador anti-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121) (Figura 11A) o anti-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 127) (Figura 11B) en presencia de Sfp. Los resultados de HPLC y ESI-MS de esta conjugación enzimática de un solo paso se resumen en la Tabla 14 e indican una marcación casi cuantitativa con un DAR=2 para ambas posiciones de etiqueta.

Tabla 14. Resultados de ESI-MS de las reacciones de conjugación con CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAF:

SEQ ID NO	Constructo de anticuerpo	Sustrato de CoA	Masa observada (Da)	Masa esperada inmuconjugado (Da)	Masa esperada anticuerpo no modificado (Da)
121	anti-hHER2-HC-T359-GDSLSWLL RLLN-K360	52189.60	52196	50525	91%
127	anti-hHER2-HC-E388-GDSLSWLL RLLN-N389	52188.40, 51412.40	52196	50525	95%

Ejemplo 13. Optimización de la reacción de marcación en función del pH.

- 20 El propósito de este experimento fue determinar el rango de pH óptimo para la conjugación catalizada por Sfp de sustratos de CoA con anticuerpos marcados con péptidos. En tres experimentos, se hicieron reaccionar 2.5 μ M de anti-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 127) o 2.5 μ M de anti-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121) con 10 μ M de CoA-MC-MMAF en presencia de 0.25 μ M de Sfp (para anti-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 127)) o 1.0 μ M de Sfp (para anti-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121)), y el pH se valoró de pH 5.0 a 10.0. Para cubrir este rango de pH, se utilizaron cinco reguladores: acetato de sodio 75 mM para pH 5.0; regulador MES 75 mM para pH 5.5, 6.0 y 6.5; regulador HEPES 75 mM para pH 7.0, 7.5 y 8.0; regulador de borato de sodio 75 mM para pH 9.0; regulador de carbonato de sodio 75 mM para pH 10.0. Todos los reguladores fueron suplementados con MgCl₂ 12.5 mM para

asegurar la actividad de la enzima. La serie de titulación de pH se realizó a 23°C durante 25 a 35 min en un volumen de 100 µL para cada reacción. Después de apagar la reacción enzimática mediante la adición de 30 µL de ácido trifluoroacético (TFA) al 4% (v/v), las mezclas de reacción se analizaron por HPLC a 280 nm como se resume en la Tabla 15.

5 Tabla 15. Resultados de HPLC de las reacciones de marcación en función del pH:

SEQ ID NO	Construido de anticuerpo (anticuerpo completo probado, el nombre representa parte de HC o LC que contiene la etiqueta peptídica, la etiqueta tipo silvestre pareada no está en la lista)	Valor de pH	DAR = 0	DAR = 1	DAR = 2
127	anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	5.0	100%; 100%	0%; 0%	0%; 0%
121	anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360		100%	0%	0%
127	anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	5.5	100%	0%	0%
127	anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	6.0	88%; 90%	12%; 10%	0%; 0%
121	anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360		100%	0%	0%
127	anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	6.5	68%	23%	9.2%
127	anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	7.0	25%; 26%	48%; 44%	28%; 31%
121	anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360		77%	23%	0%
127	anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	7.5	12%	41%	47%
127	anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	8.0	7.7%; 11%	36%; 36%	56%; 52%
121	anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360		52%	37%	11%
127	anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	9.0	12%	31 %	57%
121	anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360		32%	46%	23%
127	anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	10.0	100%	0%	0%
121	anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360		53%	36%	11%

Los resultados de la HPLC indican que el rango de pH 8 a 9 es óptimo para la conjugación de CoA-MC-MMAF a Trastuzumab marcado con péptido. En este rango de pH, la cantidad más baja de anticuerpo no acoplado (DAR = 0) y la cantidad más alta de ADC biconjugado (DAR = 2) pudieron detectarse por HPLC. Además, la representación del porcentaje de ADC con un DAR de 2 contra el pH (Figura 12) indica que el pH óptimo es independiente del sitio de inserción de la etiqueta S6 para los dos sitios analizados.

Ejemplo 14. Optimización de la reacción de marcación en función de la concentración de enzima.

Para probar la cantidad de Sfp requerida para una conjugación enzimática eficiente, se incubó anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 127) 2.5 µM a 37°C durante 16 horas con CoA MC-MMAF 50 µM en regulador HEPES 50 mM (pH 7.5) suplementado con MgCl₂ 10 mM en presencia de enzima sin Sfp o enzima Sfp 0.1, 0.25, 0.5,

1, 2.5, 5 o 10 μM . Después de 16 horas, se analizaron partes alícuotas de la reacción por ESI-MS. Para concentraciones de Sfp de 0.1 μM , el ESI-MS (Figura 13A) puede detectar principalmente anticuerpos modificados no conjugados. La conjugación cuantitativa se obtuvo para todas las concentraciones de Sfp iguales (Figura 13B) o mayores de 0.25 μM , tales como 0.5 μM , de Sfp (Figura 13C).

5 Ejemplo 15. Optimización de la reacción de marcación en función del análogo de CoA

10 Para determinar la concentración mínima de sustrato de CoA que se requeriría para la marcación cuantitativa de un anticuerpo IgG1 marcado con péptido, se incubó anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389 2.5 μM (SEQ ID NO: 127) con Sfp 0.25 μM o 1.0 μM en regulador Tris 75 mM (pH 8.0) que contiene MgCl_2 12.5 mM y se complementa con CoA-MC-MMAF en las siguientes concentraciones: 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 25 y 50 μM . La reacción se dejó proceder durante 13 horas a 23°C y luego se detuvo con 30 μl de ácido trifluoroacético (TFA) al 4% (v/v). De acuerdo con el análisis de HPLC (Figura 14A y 14B, Tabla 16), se logró una conjugación de anticuerpos casi cuantitativa para todas las concentraciones de CoA-MC-MMAF iguales o superiores a 7.5 μM . El grado de marcación fue casi independiente de la concentración de Sfp, con un 86% de especies DAR 2 observadas a Sfp 0.25 μM y un 92% de especies DAR 2 observadas a Sfp 1.0 μM .

15 Tabla 16. Resultados de HPLC de las reacciones de marcación en función de la concentración de CoA:

		Tiempo de retención		
		4.9 min	5.3 min	5.7 min
CoA-MC-MMAF (μM)	Sfp (μM)	DAR = 0	DAR = 1	DAR = 2
50	0.25	3.8 %	7.1 %	89 %
25	0.25	3.7 %	7.0 %	89 %
15	0.25	3.2 %	6.9 %	90 %
10	0.25	3.9 %	7.2 %	89 %
7.5	0.25	5.0 %	8.6 %	86 %
5	0.25	5.7 %	20.5 %	74 %
2.5	0.25	28 %	48.3 %	24 %
50	1.0	---	7.1 %	93 %
25	1.0	---	6.3 %	94 %
15	1.0	---	5.7 %	94 %
10	1.0	---	5.7 %	94 %
7.5	1.0	1.0 %	6.7 %	92 %
5	1.0	2.8 %	24 %	73 %
2.5	1.0	31 %	48 %	21 %

Para determinar el estado de agregación del inmunoconjugado anti-hHER2-HC-E388-GDS-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 1129), 5.6 mg de anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 127) (2.5 μM) se

hicieron reaccionar con CoA-MC-MMAF 40 μ M en presencia de Sfp 1 μ M en regulador HEPES 50 mM (pH 7.5) suplementado con $MgCl_2$ 10 mM. Después de la incubación a 23°C durante 3 días, la mezcla de reacción se purificó en una columna de exclusión por tamaño de Sephacryl 100-HR (Sigma). Después de confirmar la conjugación cuantitativa por ESI-MS (masa observada, 51786.40 Da; inmunoconjugado de masa esperada, 51791 Da; anticuerpo no modificado de masa esperada, 50525 Da), se analizó la estructura cuaternaria del respectivo ADC en una columna Tricorn S200 (Agilent). El ADC era principalmente monomérico (98%) y contenía cantidades traza de una especie oligomerizada (2%).

Ejemplo 16. Estabilidad térmica de los anticuerpos S6 y ADCs.

Para examinar la estabilidad térmica de los inmunoconjugados marcados con péptidos, se midieron muestras de ADC purificadas mediante fluorometría de barrido diferencial (DSF) (Tabla 17) o calorimetría de barrido diferencial (DSC) (Tabla 18). Las muestras se diluyeron a una concentración final de 0.25 mg/mL (1.67 μ M) en PBS, pH 7.4. Para la DSF, se añadió tinción de gel SYPRO Orange (Sigma) a una concentración final de 5x como indicador para indicar el despliegue térmico de los ADC. Las muestras se calentaron con 20 barridos de fluorescencia/grado en un instrumento Lightcycler (Roche). Para DSC, el despliegue térmico se controló midiendo la capacidad de calor a medida que la temperatura aumentaba a una tasa de 1 grado Celsius por minuto en un instrumento MicroCal VP-DSC. Las temperaturas de fusión se calcularon utilizando los respectivos paquetes de software del controlador, asumiendo un modelo de 3 estados.

Como se describió anteriormente (Wakankar et al. Bioconjugate Chem. 2010, 21, 1588-1595), el trastuzumab no modificado presenta dos transiciones. Las transiciones se observaron a 69.7 y 81.1 grados Celsius por DSF y 72.3 y 81.0 grados Celsius por DSC. Al igual que el anticuerpo no modificado, la mayoría de los inmunoconjugados de CoA-MC-MMAF exhiben dos transiciones aunque con diferentes amplitudes (Figura 15). Las mediciones DSF y DSC de los puntos de fusión térmica concuerdan bien, aunque la DSF reporta una primera transición aproximadamente 2 grados más baja. En general, la mayoría de los anticuerpos no conjugados diseñados y los respectivos ADC marcados con péptidos muestran poca desestabilización en comparación con el anticuerpo de tipo salvaje anti-hHER2.

Tabla 17. Estabilidad térmica medida por DSF. Los valores de ΔT_m son relativos al anticuerpo anti-hHER2 no modificado.

SEQ ID NO	Muestra (anticuerpo completo probado, el nombre representa parte de HC o LC que contiene la etiqueta peptídica, la cadena tipo silvestre pareada no está en la lista)	$T_{m1}/^{\circ}C$	$T_{m2}/^{\circ}C$	$\Delta T_{m1}/^{\circ}C$	$\Delta T_{m2}/^{\circ}C$
93/25	anti-hHER2	69.7	81.2		
94	anti-hHER2-HC-V2-GDSLWLLRLLN-Q3	70.8	---	1.1	---
95	anti-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	70.0	78.0	0.3	-3.1
102	anti-hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A	69.3	---	-0.4	---
103	anti-hHER2-HC-K133G-S134D-T135S-S136L-G137S-G138W-LLRLLN-T139	68.4	81.0	-1.3	-0.1
109	anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	69.6; 69.3	81.0; 80.6	-0.1; 0.4	-0.1; -0.5
110	anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	69.4	80.7	-0.3	-0.4
112	anti-hHER2-HC-P189D-S190-S191L-S192EL193F-G194I-T195A-Q196S-T197K-Y198L-I199A	69.4	78.6	-0.3	-2.5
113	anti-hHER2-HC-S190G-S191D-S192-L193-G194S-T195W-Q196L-T197L-RLLN-Y198	68.1	78.1	-1.7	-3.1

ES 2 703 540 T3

SEQ ID NO	Muestra (anticuerpo completo probado, el nombre representa parte de HC o LC que contiene la etiqueta peptídica, la cadena tipo silvestre pareada no está en la lista)	Tm1/°C	Tm2/°C	ΔTm1/°C	ΔTm2/°C
114	anti-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L	67.8	---	-1.9	---
115	anti-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L-C200A	67.1	---	-2.6	---
116	anti-hHER2-HC-S191D-S192-L193-G194E-T195F-Q196I-T197A-Y198S-I199K	69.3	---	-0.4	---
121	anti-hHER2-HC-T359-GDSLWLLRLLN-K360	70.1; 70.3	81.7; 81.7	0.3; 0.5	0.6; 0.6
1117	anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	68.4; 68.6	81.5; 81.4	-1.3; 1.2	0.4; 0.3
122	anti-hHER2-HC-T359-DSLEFIASKLA-K360	70.1	81.7	0.3	0.6
127	anti-hHER2-HC-E388-GDSLWLLRLLN-N389	66.6	81.5	-3.1	0.4
1118	anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	66.3	81.0	-3.4	-0.1
1107	anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	66.7	80.9	-3.0	-0.2
131	anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASK-N389	69.4	81.6	-0.3	0.5
130	anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	68.9	81.5	-0.9	0.4
129	anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	69.3	81.6	-0.4	0.5
135	anti-hHER2-HC-L398D-D399S-S400L-D401E-G402F-S403I-F404A-F405S-L406K-Y407L-S408A	49.2	81.2	-20.6	0.1
141	anti-hHER2-HC-K447-DSLEFIASKLA	70.1	81.0	0.4	-0.1
27	anti-hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3	70.0	78.8	0.2	-2.3
29	anti-hHER2-LC-C214-DSLEFIASKLA	69.7	80.9	0.0	-0.2

Tabla 18. Estabilidad térmica medida por DSC. Los valores de ΔTm son relativos al anticuerpo anti-hHER2 no modificado.

SEQ ID No (anticuerpo)	Muestra	Tm1/°C	Tm2/°C	Tm3/°C	ΔTm1/°C	ΔTm2/°C
93/25	anti-hHER2	72.3; 72.3	80.9; 81.0	---		

ES 2 703 540 T3

SEQ ID No (anticuerpo)	Muestra	Tm1/ °C	Tm2/ °C	Tm3/ °C	ΔTm1/°C	ΔTm2/°C
95	anti-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	72.3	77.9	83.3	0.1	-3.1
1120	anti-hHER2-HC-V2-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q3	70.4	82.6	---	-1.9	1.7
102	anti-hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A	70.3	76.2	83.3	-2.0	-4.8
103	anti-hHER2-HC-K133G-S134D-T135S-S136L-G137S-G138W-LLRLLN-T139	69.7	80.5	---	-2.6	-0.5
109	anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	72.8; 70.7	80.1; 79.9	---	0.5; -1.6	-0.9; -1.1
110	anti-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	71.2	80.0	---	-1.1	-1.0
121	anti-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	70.4; 70.6	80.9; 80.6	---	-1.9; -1.6	-0.1; -0.4
1117	anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	68.7	80.6	---	-3.6	-0.4
1117	anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	68.8	80.4	---	-3.5	-0.6
122	anti-hHER2-HC-T359-DSLEFIASKLA-K360	71.8	80.9	---	-0.5	-0.1
1118	anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	67.0	80.2	---	-5.3	-0.8
1107	anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	66.0	80.1	---	-6.3	-0.9
131	anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASK-N389	71.2	80.8	---	-1.0	-0.2
130	anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	70.7	80.8	---	-1.6	-0.2
1121	anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKL-N389	69.9	80.2	---	-2.3	-0.8
129	anti-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	71.1	80.8	---	-1.2	-0.2
1122	anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	70.2	80.3	---	-2.1	-0.7
135	anti-hHER2-HC-L398D-D399S-S400L-D401E-G402F-S403I-F404A-F405S-L406K-Y407L-S408A	---	81.0	---	---	0.1

SEQ ID No (anticuerpo)	Muestra	Tm1/ °C	Tm2/ °C	Tm3/ °C	ΔTm1/°C	ΔTm2/°C
141	anti-hHER2-HC-K447-DSLEFIASKLA	72.7	81.0	---	0.4	0.1
29	anti-hHER2-LC-C214-DSLEFIASKLA	71.6	81.1	---	-0.7	0.1

Ejemplo 17. Propiedades farmacocinéticas de ADC marcados con péptidos.

Para verificar la estabilidad *in vivo* de dos ADC de Trastuzumab marcados con péptidos con una carga útil de MMAF (DAR de 2), se realizó un estudio farmacocinético (PK) en ratones. Anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 1117) y anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 1118) fueron inyectados i.v. en 3 ratones usando concentraciones de ADC de 1.0 mg/kg. Se recogieron 10 muestras a las 0.2, 1, 3, 7, 24, 48, 96, 168, 240 y 336 horas. Los títulos plasmáticos de ambos ADC se monitorizaron hasta dos semanas utilizando ensayos ELISA con IgG antihumana, así como anticuerpos anti-MMAF y placas ELISA recubiertas con HER2 humano truncado (dominios extracelulares 3-4). Los resultados de ELISA se compararon con los estudios de PK de un Trastuzumab IgG1 no modificado. Mientras que el anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 1117) mostró una rápida decadencia en ratones en comparación con el trastuzumab no modificado, anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 1118) exhibió una eliminación en suero similar al trastuzumab no modificado durante un período de dos semanas (Figura 16). Para ambos ADCs, los títulos de anti-hIgG y anti-MMAF se rastrean entre sí, lo que sugiere que poco o ningún fármaco se pierde durante la exposición *in vivo* en ratones.

Ejemplo 18. Potencia *in vitro* de ADC marcados con péptidos

Los ensayos de destrucción celular *in vitro* de ADC marcados con péptidos se llevaron a cabo con la línea celular MDA-231 que expresa HER2. Los ADC con DAR = 2 se prepararon como se describe en el Ejemplo 6 haciendo reaccionar anti-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 121) y anti-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 127) con MC-MMAF no escindible y MC-ValCit-PABC-MMAF escindible (Ejemplo 12). La potencia *in vitro* de los ADC correspondientes, anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 1117), anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 1118), anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-K360 (SEQ ID NO: 1108) y anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389 (SEQ ID NO: 1107) se probaron en PC3-31 (alto número de copias de HER2) y PC3 (bajo número de copias de HER2) células diseñadas por ErbB2. Con respecto a la línea celular PC3-31, todos los ADC marcados con péptidos revelaron potentes actividades citotóxicas con concentraciones efectivas a la mitad (EC₅₀) en el rango picomolar. En contraste, los valores de EC₅₀ correspondientes en las células PC3 fueron superiores a 60 nM. Los resultados se resumen en la Tabla 19 y la Figura 17 e indican que los cuatro conjugados son ADC altamente potentes y destruyen las células positivas para HER2/neu de una manera dependiente del antígeno.

Tabla 19. Potencia *in vitro* de inmunoconjugados de MMAF conjugados con etiqueta S6.

SEQ ID NO	ADC	Valor EC ₅₀	
		Línea celular PC3-31	Línea celular PC3
1117	anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	7.9 ng/mL; 53 pM	>9,000 ng/mL; >60 nM
1118	anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	8.5 ng/mL; 57 pM	>9,000 ng/mL; >60 nM
1108	anti-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	7.7 ng/mL; 51 pM	>9,000 ng/mL; >60 nM
1107	anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	1.6 ng/mL; 11 pM	>9,000 ng/mL; >60 nM

Ejemplo 19. Marcación de IgG marcadas con péptido con un análogo de CoA citotóxico en medios de cultivo celular

La bioortogonalidad de la 4'-fosfopanteteinilación catalizada por PPTasa permite la marcación específica del sitio de IgG marcadas con péptidos en mezclas complejas tales como medio condicionado. Después de la secreción del anticuerpo marcado con péptido, la PPTasa agregada exógenamente (como Sfp) y el sustrato de CoA de fármaco (como CoA-MC-MMAF) conducen a la formación de ADCs homogéneos, que se pueden purificar en una sola etapa mediante cromatografía de afinidad de proteína A.

Por ejemplo, las células HEK293F se transfectaron con ADN plasmídico que codifica la cadena pesada de IgG1 con inserción de la etiqueta S6 en el dominio CH3 y el ADN plasmídico que codifica la cadena ligera kappa no modificada. Los 40 mL de cultivo en suspensión HEK293F se cultivaron durante cinco días a 37°C. Después de la recolección por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante del medio se complementó con una concentración final de CoA-MC-MMAF 40 µM, MgCl₂ 10 mM y HEPES 50 mM (pH 7.5). El sobrenadante del medio se dividió luego en dos alícuotas de 20 mL. Se añadió enzima Sfp producida de forma recombinante (5 µM) a una de las partes alícuotas (consulte la Tabla 20, Experimento #2) y se dejó que la reacción enzimática transcurriera durante 24 horas a temperatura ambiente.

Tabla 20. Esquema de marcación en el medio.

Experimento #	1	2
Adición de CoA-MC-MMAF (40 µM) al sobrenadante del medio	X	X
Adición de Sfp (5 µM) al sobrenadante del medio		X

La purificación de anticuerpos se llevó a cabo utilizando columnas de Proteína A Sepharose Fast Flow con 0.25 mL de volumen de lecho para cada experimento. Después del equilibrio con PBS, los sobrenadantes del medio se aplicaron a las columnas a una rata de flujo de aproximadamente 1 mL/min y se recogió el flujo a través. Después del lavado con 20 volúmenes de columna de PBS, el anticuerpo unido se eluyó utilizando 6 volúmenes de columna de acetato de sodio 0.1 M (pH 3.0) seguido de neutralización inmediata con Tris/HCl 1 M (pH 10) para alcanzar un pH final de aproximadamente 8. La pureza de los eluidos se evaluó mediante análisis SDS-PAGE y el rendimiento del anticuerpo se determinó mediante el método de Bradford. Finalmente, la formación de ADC en el medio dependiente de Sfp se confirmó mediante el análisis por ESI-MS y HPLC de los eluidos de la proteína A.

Ejemplo 20. Marcación *in vitro* de IgG marcadas con péptidos con acetil CoA y posterior conjugación con una citotoxina

El principio de la preparación de conjugados inmunes a través de acetil CoA es un protocolo de conjugación quimioenzimática de tres etapas en donde la unidad estructural acetilo sirve como grupo protector para el grupo tiol reactivo de CoA. Además, aunque las PPTasas como Sfp toleran grandes análogos de CoA (por ejemplo, peptidil-CoA) para la catálisis, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) se reduce significativamente en comparación con la propia CoA (véase, Sieber et al., J. Am. Chem. Soc. 125: 10862-10866 (2003)). Por lo tanto, se espera que el pequeño grupo acetilo garantice una cinética enzimática similar a la observada para el sustrato de CoA nativo.

Por ejemplo, la conjugación covalente de la unidad estructural ppan acetilada con un anticuerpo IgG marcado con péptido se lleva a cabo como se describe en el Ejemplo 6 usando acetil CoA en lugar de CoA-MC-MMAF. Después de confirmar la conjugación cuantitativa por ESI-MS, el conjugado se dializa en regulador de reacción (fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.2), NaCl 0.15 M). El conjugado dializado se concentra a aproximadamente 5 mg/mL y se complementa con 10% (v/v) de solución de desacetilación que contiene regulador de reacción (pH 7.2) con hidroxilamina 0.5 M y EDTA 25 mM. Esta reacción química de escisión del tioéster se deja proceder durante 3 horas a temperatura ambiente, seguido de un intercambio de la mezcla de reacción en regulador de reacción (pH 7.2) complementado con EDTA 10 mM. Después de la confirmación de la desacetilación cuantitativa por ESI-MS, la unidad estructural ppan desprotegida se conjuga luego con 15 equivalentes de maleimida-MC-MMAF reactiva con tiol (0.5 mM) durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se detiene por intercambio de regulador en PBS. Finalmente, la formación cuantitativa de ADC se confirma mediante análisis ESI-MS y HPLC.

Ejemplo 21. Marcación de IgG marcadas con péptido con acetil CoA en medios de cultivo celular y posterior conjugación con una citotoxina

La bioortogonalidad de la generación de ADCs homogéneas catalizada por PPTasa permite la marcación específica del sitio de IgG en medios de cultivo celular (véase Ejemplo 19). En lugar de unir directamente la molécula del fármaco citotóxico al anticuerpo, también es posible llevar a cabo la marcación en el medio con acetil CoA para la generación de ADC mediante un proceso de conjugación quimioenzimática de tres etapas. El análogo pequeño de acetil CoA

permite reacciones de conjugación con una eficiencia catalítica mejorada (k_{cat}/K_M) en comparación con los análogos de CoA citotóxicos grandes, lo que reduce significativamente la cantidad de enzima necesaria para la conjugación cuantitativa. Además, para el desarrollo del proceso, sería ventajoso realizar reacciones de marcación en grandes volúmenes de cultivo con compuestos no tóxicos. La IgG marcada con péptido conjugada con la unidad estructural acetil-ppan puede purificarse en una sola etapa usando cromatografía de afinidad de proteína A. Para preparar el conjugado inmune a partir del anticuerpo conjugado acetil-ppan purificado, las dos reacciones químicas posteriores se llevan a cabo como se describe en el Ejemplo 20.

Ejemplo 22. Marcación de IgG marcadas con péptidos con acetil CoA o análogos bioortogonales de CoA en medios de cultivo celular y posterior conjugación con una citotoxina

La bioortogonalidad de la generación de ADC homogénea catalizada por PPTasa también permite la marcación específica del sitio de IgG en medios de cultivo celular (véase Ejemplo 19). En lugar de unir directamente la molécula del fármaco citotóxico al anticuerpo, también es posible llevar a cabo la marcación en el medio con acetil CoA para la generación de ADC mediante un proceso de conjugación quimioenzimática de tres etapas. El análogo pequeño de acetil CoA permite reacciones de conjugación con una eficiencia catalítica mejorada (k_{cat}/K_M) en comparación con los análogos de CoA citotóxicos grandes, lo que reduce significativamente la cantidad de enzima necesaria para la conjugación cuantitativa. Además, para el desarrollo del proceso, sería ventajoso realizar reacciones de marcación en grandes volúmenes de cultivo con compuestos no tóxicos. La IgG marcada con péptido conjugada con la unidad estructural acetil-ppan puede purificarse en una sola etapa usando cromatografía de afinidad de proteína A. Para preparar el conjugado inmune a partir del anticuerpo conjugado acetil-ppan purificado, las dos reacciones químicas posteriores se llevan a cabo como se describe en el Ejemplo 20.

Como alternativa, en lugar de usar acetil CoA, la marcación en el medio también se puede realizar con análogos de CoA unidos covalentemente a grupos bioortogonales, tales como unidades estructurales azido, alqueno, alquino, cetona o aldehído. Después de la catálisis en PPTasa en el medio, el anticuerpo marcado con péptido con el grupo bioortogonal unido a ppan se purifica hasta homogeneidad utilizando cromatografía de afinidad de proteína A. Como último paso de esta estrategia de marcación quimioenzimática de dos etapas para la preparación de ADC, la reacción con el grupo bioortogonal complementario conduce a la unión específica del sitio de la unidad estructural de fármaco al anticuerpo. La Figura 22 ejemplifica el método de dos etapas para la unión específica del sitio de análogos de CoA funcionalizados con carbonilo a un anticuerpo marcado con A1 seguido de ligación de oxima del grupo terminal (TG). Después de realizar el primer paso en medio de cultivo celular, el anticuerpo funcionalizado con carbonilo resultante se purifica mediante purificación por afinidad con proteína A. El segundo paso luego implica la reacción del grupo carbonilo unido a ppan con un TG derivado con aminooxi. Después de la reacción, el exceso de TG se elimina mediante diálisis o intercambio de regulador. La síntesis de un análogo de CoA funcionalizado con carbonilo (CoA de cetona) se describe en el Ejemplo 23.

Ejemplo 23. Síntesis de cetona CoA

Se añadieron 784 μ L de una solución acuosa CoA-SH 25 mM (20 μ mol, Sigma-Aldrich) a 9.0 mL de regulador fosfato de sodio 100 mM (pH 7.1). Después de diluir la metil vinil cetona (30 μ mol, Sigma-Aldrich) 10 veces en H₂O, se agregaron 25 μ L de la solución acuosa resultante a la solución de CoA-SH 2 mM. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se detuvo en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

La mezcla de reacción se purificó en una columna SunFire Prep C₁₈ (Waters) con un tamaño de partícula de 5 μ m y dimensiones de 10 x 100 mm. Después de inyectar 4-6 mL de mezcla de reacción, se aplicó el siguiente gradiente entre 0.1% (v/v) de TFA/agua (A) y 0.1% (v/v) de TFA/acetonitrilo (B) a una rata de flujo de 5 mL/min.

Tiempo (min)	%B
0	5
5	5
30	100

La cetona CoA purificada por HPLC se confirmó por LC-MS. ESI-MS calculada para C₂₅H₄₃N₇O₁₇P₃S [MH]⁺: 838.2; observada: 838.1. El producto deseado se liofilizó y se obtuvieron 2.93 mg (3.5 μ mol) de cetona CoA con un rendimiento del 18%.

Ejemplo 24. Producción y propiedades de ADCs con un DAR de 4

Pueden generarse ADCs con un DAR de 4 insertando/injertando múltiples etiquetas peptídicas en un anticuerpo, que son sustratos de la misma enzima (Figura 19A). Por ejemplo, tanto la etiqueta ybbR como la S6 son reconocidas como sustratos por el PPTasa Sfp. A la inversa, el marcado de anticuerpos con múltiples ligandos diferentes se logra insertando/injertando etiquetas peptídicas en un anticuerpo, que son sustratos de dos PPTasas diferentes. Por ejemplo, la etiqueta A1 es reconocida exclusivamente por AcpS PPTasa, mientras que la etiqueta S6 es modificada preferentemente por la PPTasa Sfp. Además, los inmunoconjugados con DAR más altos (por ejemplo, DAR de 6, 8, 10, 12, etc.) pueden generarse agregando etiquetas adicionales. La conjugación enzimática también se puede combinar con otras estrategias de marcación como la conjugación específica del sitio a través de cisteína, pirrolisina, pirrolina-carboxi-lisina y aminoácidos no naturales, así como métodos quimioselectivos como las químicas selectivas de Lys, Cys o Tyr.

Para preparar ADCs homogéneos con un DAR de 4, se incorporaron dos etiquetas peptídicas en la cadena pesada de Trastuzumab IgG1, concretamente una etiqueta S6 en el dominio V_H y una etiqueta ybbR en el dominio CH3 (anti-hHER2-HC-V2-GDSLWLLRLLN-Q3-E388-DSLEFIASKLA-N389 (SEQ ID NO: 142)). Este anticuerpo de doble etiqueta se expresó en células HEK293F en una escala de 50 mL. Después de la transfección, las células HEK293F se cultivaron durante cinco días antes de la recolección por centrifugación a 3400 rpm durante 15 min. El sobrenadante del medio resultante se filtró a través de un filtro de tamaño de poro de 0.22 µm. La purificación se realizó utilizando una columna de Flujo Rápido de Proteína A Sepharose (GE Healthcare) con un volumen de lecho de 0.6 mL, que se equilibró con 20 volúmenes de columna de PBS. El sobrenadante del medio filtrado se cargó a una rata de flujo de aproximadamente 1 mL/min. Después de lavar la columna con 20 volúmenes de columna de PBS, el anticuerpo marcado con péptido se eluyó con 5 volúmenes de columna de acetato de sodio 0.1 M (pH 3.0) seguido de neutralización inmediata con Tris/HCl 1 M (pH 10) hasta un pH final de aproximadamente 8. Según el método de Bradford, el rendimiento total fue de 8 mg de anticuerpo purificado por litro de cultivo. La pureza del constructo del anticuerpo se evaluó mediante electroforesis en gel SDS. Después de la concentración con una unidad de filtro centrífuga Amicon Ultra de 30 kDa, se incubó anti-hHER2-HC-V2-GDSLWLLRLLN-Q3-E388-DSLEFIASKLA-N389 (SEQ ID NO: 142) con CoA-MC-MMAF50 µM, Sfp 1 µM, MgCl₂ 12.5 mM, en regulador HEPES 75 mM, pH 7.5, a 23°C durante 16 horas para marcar enzimáticamente el anticuerpo de doble marcación con cuatro moléculas de fármaco.

El espectro de masas desconvolucionado del constructo de anticuerpo reducido y desglicosilado confirmó la unión covalente de dos unidades ppan-MC-MMAF a cada cadena pesada de Trastuzumab (masa observada, 54223.20 Da; masa esperada, 54231 Da). ESI-MS no observó ninguna especie desacoplada (masa esperada, 51700 Da) ni monoetiquetada (masa esperada, 52966 Da). La conversión casi cuantitativa a un ADC con un DAR de 4 (95% de acuerdo con la integración del área de pico) se confirmó adicionalmente mediante análisis de HPLC (Figura 19B).

Ejemplo 25. Generación de una biblioteca completa de ADC marcados con péptidos utilizando la Plataforma de Expresión y Purificación de Proteínas (PEPP)

Sobre la base del examen de la estructura cristalina del anticuerpo IgG1 B12 humano, así como los cálculos de accesibilidad a la superficie (Ejemplo 1), se propuso una biblioteca de 268 constructos de IgG1 de trastuzumab etiquetados con péptidos. La inserción sistemática de las secuencias de la etiqueta S6 e ybbR en las regiones constantes se realizó mediante los métodos estándar de biología molecular utilizando los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 8. La secuencia confirmó que los plásmidos que albergan los genes de la cadena pesada o ligera de trastuzumab se usaron para la cotransfección transitoria de 293 células Freestyle™ según el método PEI (Meissner et al., 2001). El cultivo de cada miembro de la biblioteca en un volumen de 35 mL de medio de expresión Freestyle™ (Invitrogen) durante cinco días a 37°C bajo 5% de CO₂ se llevó a cabo en el sistema PEPP (González R, Jennings LL, Knuth AP, Orth AP, Klock HE, Ou W, Feuerhelm J, Hull MV, Koesema E, Wang Y, Zhang J, Wu C, Cho CY, Su AI, Batalov S, Chen H, Johnson K, Laffitte B, Nguyen DG, Snyder EY, Schultz PG, Harris JL, Lesley SA. Proc Natl Acad Sci USA. 2010, 107(8): 3552-7). Después de la recolección celular automatizada, se usó el mismo sistema para purificar la biblioteca de anticuerpos marcados con péptidos mediante cromatografía de afinidad con Proteína A. En resumen, después de una filtración de 0.22 µm del medio sobrenadante, cada filtrado se cargó en una columna de afinidad de Proteína A que contenía 0.2 mL de resina sedimentada a una rata de flujo aproximado de 1 mL/min. La columna se lavó luego con 20 volúmenes de columna de PBS seguido de elución con 5 volúmenes de columna de acetato de sodio 0.1 M, pH 3.0. El eluido se neutralizó inmediatamente con un 25% (v/v) de Tris-HCl 1 M (pH 8.0).

Para determinar el rendimiento de los anticuerpos purificados con proteína A (Tabla 21), las concentraciones de proteína de los eluidos se midieron por duplicado en un espectrofotómetro ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies) a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción molar preestablecido para las moléculas de IgG. Después de concentrar los anticuerpos marcados con péptido utilizando dispositivos de filtro centrífugo Amicon Ultra-0.5 de corte de 30 kDa (EMD Millipore), se realizaron reacciones de conjugación catalizadas por enzimas durante aproximadamente 16 horas a 20°C con anticuerpo 2.5 µM marcado con péptido, sustrato CoA-MC-MMAF20 µM, y enzima Sfp 1 µM en regulador Tris-HCl (75 mM, pH 8.0) suplementado con MgCl₂ 12.5 mM y NaCl 20 mM. El grado de marcación de los anticuerpos marcados con péptidos se cuantificó mediante HPLC analítica en una columna PLRP-S (4000 Å, 5 µm, 50 x 4.6 mm, Agilent Technologies) con un gradiente lineal de 6 minutos de acetonitrilo al 25-50% en agua que contenía 0.1% de ácido trifluoroacético. Los correspondientes anticuerpos no acoplados se utilizaron como controles negativos (Tabla 21). Después de concentrar los conjugados de anticuerpos utilizando los dispositivos de filtro centrífugo Amicon Ultra-4 (EMD Millipore), las reacciones enzimáticas se analizaron adicionalmente mediante espectrometría de masas en un instrumento Agilent 6520 Q-TOF (Agilent Technologies). Los espectros de ESI-MS deconvolucionados de los

conjugados de anticuerpos reducidos y desglicosilados se obtuvieron utilizando 10 µl de mezcla de reacción concentrada (Tabla 21).

Los constructos de ADC marcados con péptidos se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de Ni-NTA (ácido níquel-nitrilotriacético) para eliminar la enzima Sfp y el exceso de sustrato de CoA-MC-MMAF. Después de equilibrar las columnas de Ni-NTA (0.2 mL de volumen de lecho cada una) con PBS, las muestras de conjugación concentradas se cargaron en las columnas a una tasa de flujo aproximado de 1 mL/min. A continuación, las columnas se lavaron con 20 volúmenes de columna de PBS seguido de elución con 5 volúmenes de columna de regulador Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) complementado con imidazol 250 mM y NaCl 300 mM. De acuerdo con el ensayo de Bradford, la recuperación de los ADC marcados con péptidos promedió el 39% del material de partida purificado con Proteína A. El sistema PEPP luego se usó para intercambiar de manera amortiguada cada muestra en PBS usando las columnas NAP-10 (GE Healthcare). Después del intercambio de regulador, los ADC marcados con péptidos se concentraron utilizando dispositivos de filtro centrífugo Amicon Ultra-4 (EMD Millipore), y las concentraciones de los conjugados se ajustaron por dilución con PBS. Ajustadas a la concentración apropiada, las muestras de ADC se caracterizaron además por DSF (fluorimetría de barrido diferencial), LC90 (LabChip 90), AnSEC (cromatografía de exclusión de tamaño analítica) y ensayos de potencia *in vitro* (datos no mostrados).

De los 268 anticuerpos de trastuzumab marcados con el péptido originalmente planificados, la expresión se probó para 183 constructos (68%). Los niveles de expresión exhiben una gran variabilidad que varía de 0 a más de 30 mg de anticuerpo por litro de cultivo (Tabla 21), con un promedio de 16 mg ($\pm$ 8 mg de desviación estándar) de anticuerpo por litro de cultivo. Además, los niveles de expresión se correlacionan con la posición de la inserción de la etiqueta peptídica con los 46 constructos de cadena ligera (13 ± 8 mg por litro de cultivo) que muestran niveles de expresión promedio más bajos que los 137 constructos de cadena pesada (17 ± 8 mg por litro de cultivo). Los niveles de expresión también dependen del tipo de etiqueta peptídica: 95 constructos de anticuerpos con inserciones de etiqueta ybbR en promedio muestran niveles de expresión más altos (19 ± 7 mg por litro de cultivo) que los 88 constructos correspondientes con inserciones de etiqueta S6 (13 ± 8 mg por litro cultura). La tendencia opuesta se observa para las eficiencias de conjugación basadas en el análisis de HPLC de fase inversa: 44 constructos marcadas con péptidos (72%) con formación casi cuantitativa de ADC (relación fármaco a anticuerpo ≥ 1.9) se basan en la inserción de la secuencia peptídica S6, mientras que solo 17 (28%) anticuerpos marcados con ybbR mostraron una conversión casi cuantitativa al ADC correspondiente.

En promedio, los constructos de cadena pesada se conjugaron más eficazmente que las inserciones de péptidos en la cadena ligera: el 19% (8 de 43) de Los constructos con inserciones de la etiqueta del péptido en la cadena ligera reveló DAR de al menos 1.9 mientras que el 40% (53 de 131) de Los constructos con inserciones de etiquetas peptídicas en la cadena pesada podrían conjugarse con la misma eficacia. Las mejores eficiencias de conjugación globales se muestran mediante inserciones de etiquetas peptídicas en varias regiones de bucle del dominio CH1. En general, de los 183 anticuerpos marcados con péptidos expresados, las eficiencias de conjugación de 174 constructos se podrían determinar con 61 constructos (35%) que produzcan relaciones de fármaco a anticuerpo (DAR) de 1.9 o más.

La termoestabilidad de los ADC resultantes depende del sitio de inserción de la etiqueta del péptido. Por ejemplo, la mayoría de las inserciones de etiquetas peptídicas en el dominio CH2 conducen a una disminución significativa de la transición térmica observada más baja (T_m) según las mediciones de DSF (fluorimetría de barrido diferencial) como se ilustrará con más detalle en el Ejemplo 26. Se observó poca agregación u oligómeros de anticuerpos para 135 (87%) de 156 ADCs marcados con péptidos que se examinaron mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño ($\geq 90\%$ de especies monoméricas). La potencia *in vitro* de los ADC marcados con péptidos se correlacionó como se esperaba con su grado de marcación. Aunque se puede generar un gran número de ADC marcados con péptidos con propiedades preferidas, los datos también ilustran que el rendimiento de la expresión, la estabilidad térmica, la eficiencia de la conjugación y otras propiedades se ven muy afectadas por la elección del sitio de inserción de la etiqueta.

Tabla 21. Preparación de ADC y caracterización del material preparado en el sistema PEPP.

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:150	anti-hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	SEQ ID NO: 1136	10	2.0	50525.0	51790.5	51792.7 51814.6

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:151	anti-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-T120	SEQ ID NO: 1137	12	2.0	50525.0	51790.5	51792.4
SEQ ID NO:152	anti-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-K121	SEQ ID NO: 1138	11	2.0	50525.0	51790.5	51797.2
SEQ ID NO:157	anti-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-S136	SEQ ID NO: 1139	24	2.0	50525.0	51790.5	51792.8
SEQ ID NO:158	anti-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-G137	SEQ ID NO: 1140	20	2.0	50525.0	51790.5	51792.0
SEQ ID NO:160	anti-hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-T139	SEQ ID NO: 1141	14	2.0	50525.0	51790.5	51792.3 51814.6
SEQ ID NO:161	anti-hHER2-HC-E152-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-P153	SEQ ID NO: 1142	3	0.2	50525.0	51790.5	50528.4 51794.8
SEQ ID NO:162	anti-hHER2-HC-P153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-V154	SEQ ID NO: 1143	0	N/A	50525.0	51790.5	N/A
SEQ ID NO:163	anti-hHER2-HC-N159-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-S160	SEQ ID NO: 1144	0	N/A	50525.0	51790.5	N/A
SEQ ID NO:164	anti-hHER2-HC-S160-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-G161	SEQ ID NO: 1145	10	1.4	50525.0	51790.5	51792.0
SEQ ID NO:165	anti-hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-A162	SEQ ID NO: 1146	9	1.3	50525.0	51790.5	51798.0 50529.2

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:166	anti-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-L163	SEQ ID NO: 1147	15	2.0	50525.0	51790.5	51798.4
SEQ ID NO:168	anti-hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-S165	SEQ ID NO: 1148	22	2.0	50525.0	51790.5	51796.8
SEQ ID NO:169	anti-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-G166	SEQ ID NO: 1149	15	2.0	50525.0	51790.5	51794.4
SEQ ID NO:170	anti-hHER2-HC-P171-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-A172	SEQ ID NO: 1150	3	N/A	50525.0	51790.5	N/A
SEQ ID NO:171	anti-hHER2-HC-S176-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-S177	SEQ ID NO: 1151	8	1.9	50525.0	51790.5	51791.7 51812.9
SEQ ID NO:173	anti-hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-S190	SEQ ID NO: 1152	24	1.5	50525.0	51790.5	51792.4
SEQ ID NO:175	anti-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-S192	SEQ ID NO: 1153	21	2.0	50525.0	51790.5	51792.0 51814.0
SEQ ID NO:176	anti-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-L193	SEQ ID NO: 1154	32	2.0	50525.0	51790.5	51792.0 51813.7
SEQ ID NO:177	anti-hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-G194	SEQ ID NO: 1155	18	2.0	50525.0	51790.5	51791.0
SEQ ID NO:178	anti-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-T195	SEQ ID NO: 1156	19	2.0	50525.0	51790.5	51796.8

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:179	anti-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	SEQ ID NO: 1157	17	2.0	50525.0	51790.5	51800.0 53918.8
SEQ ID NO:180	anti-hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	SEQ ID NO: 1158	23	1.9	50525.0	51790.5	51791.9 51813.5
SEQ ID NO:181	anti-hHER2-HC-K205-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P206	SEQ ID NO: 1159	22	0.2	50525.0	51790.5	50526.7 51792.6 50548.6
SEQ ID NO:182	anti-hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	SEQ ID NO: 1160	25	1.9	50525.0	51790.5	51792.1 51813.9
SEQ ID NO:185	anti-hHER2-HC-A231-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	SEQ ID NO: 1161	35	2.0	50525.0	51790.5	51789.5 51810.4
SEQ ID NO:187	anti-hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	SEQ ID NO: 1162	13	1.9	50525.0	51790.5	51789.5 51770.4 51809.6
SEQ ID NO:189	anti-hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	SEQ ID NO: 1163	16	1.9	50525.0	51790.5	51790.1 51811.8
SEQ ID NO:191	anti-hHER2-HC-P244-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P245	SEQ ID NO: 1164	12	0.8	50525.0	51790.5	50522.7 51790.6 50545.4
SEQ ID NO:193	anti-hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	SEQ ID NO: 1165	23	1.9	50525.0	51790.5	51789.0 51809.6
SEQ ID NO:194	anti-hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	SEQ ID NO: 1166	20	2.0	50525.0	51790.5	51789.5 51810.5

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:195	anti-hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	SEQ ID NO: 1167	25	2.0	50525.0	51790.5	51792.2 51814.5
SEQ ID NO:198	anti-hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	SEQ ID NO: 1168	20	2.0	50525.0	51790.5	51789.2 51810.1
SEQ ID NO:199	anti-hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	SEQ ID NO: 1169	10	2.0	50525.0	51790.5	51789.6 51810.0
SEQ ID NO:200	anti-hHER2-HC-E269-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-D270	SEQ ID NO: 1170	0	N/A	50525.0	51790.5	N/A
SEQ ID NO:201	anti-hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	SEQ ID NO: 1171	18	2.0	50525.0	51790.5	51789.8 51771.0 51811.2
SEQ ID NO:202	anti-hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	SEQ ID NO: 1172	8	2.0	50525.0	51790.5	51796.4
SEQ ID NO:206	anti-hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	SEQ ID NO: 1173	23	1.8	50525.0	51790.5	51789.8 51811.3
SEQ ID NO:207	anti-hHER2-HC-T307-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V308	SEQ ID NO: 1174	4	n.d.	50525.0	51790.5	51793.6 50526.4
SEQ ID NO:209	anti-hHER2-HC-L309-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H310	SEQ ID NO: 1175	10	n.d.	50525.0	51790.5	51795.6 50530.8
SEQ ID NO:211	anti-hHER2-HC-N315-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G316	SEQ ID NO: 1176	13	0.9	50525.0	51790.5	51788.9 50523.3 51810.4

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:212	anti-hHER2-HC-G316-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-K317	SEQ ID NO: 1177	7	0.8	50525.0	51790.5	50524.1 51789.7 50545.9
SEQ ID NO:215	anti-hHER2-HC-A327-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-L328	SEQ ID NO: 1178	14	0.5	50525.0	51790.5	51789.9 50522.7
SEQ ID NO:216	anti-hHER2-HC-L328-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-P329	SEQ ID NO: 1179	16	1.0	50525.0	51790.5	51789.8 50523.2 51810.9
SEQ ID NO:217	anti-hHER2-HC-P329-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-A330	SEQ ID NO: 1180	18	1.5	50525.0	51790.5	51790.1 51811.9
SEQ ID NO:218	anti-hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-P331	SEQ ID NO: 1181	9	1.7	50525.0	51790.5	51792.4 50527.6
SEQ ID NO:220	anti-hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-G341	SEQ ID NO: 1182	6	1.8	50525.0	51790.5	51792.4 51604.8
SEQ ID NO:221	anti-hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-Q342	SEQ ID NO: 1183	26	1.9	50525.0	51790.5	51790.0
SEQ ID NO:222	anti-hHER2-HC-Q342-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-P343	SEQ ID NO: 1184	0	N/A	50525.0	51790.5	N/A
SEQ ID NO:223	anti-hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-R344	SEQ ID NO: 1185	14	2.0	50525.0	51790.5	51792.2 51809.3
SEQ ID NO:224	anti-hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-E345	SEQ ID NO: 1186	16	2.0	50525.0	51790.5	51794.4

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:229	anti-hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	SEQ ID NO: 1187	26	2.0	50525.0	51790.5	51796.8
SEQ ID NO:230	anti-hHER2-HC-N384-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G385	SEQ ID NO: 1188	2	2.0	50525.0	51790.5	51792.8
SEQ ID NO:127	anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	SEQ ID NO: 1118	23	2.0	50525.0	51790.5	51794.4
SEQ ID NO:232	anti-hHER2-HC-T394-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P395	SEQ ID NO: 1189	3	0.7	50525.0	51790.5	51793.2 50525.2
SEQ ID NO:233	anti-hHER2-HC-P395-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P396	SEQ ID NO: 1190	4	n.d.	50525.0	51790.5	51794.6 51773.9 51820.4
SEQ ID NO:235	anti-hHER2-HC-D401-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G402	SEQ ID NO: 1191	10	0.2	50525.0	51790.5	51793.7 51818.2
SEQ ID NO:236	anti-hHER2-HC-S415-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R416	SEQ ID NO: 1192	5	1.1	50525.0	51790.5	51792.8 50526.8
SEQ ID NO:237	anti-hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	SEQ ID NO: 1193	5	1.7	50525.0	51790.5	51794.1
SEQ ID NO:238	anti-hHER2-HC-W417-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q418	SEQ ID NO: 1194	15	1.4	50525.0	51790.5	51798.8 51921.6 ^g
SEQ ID NO:239	anti-hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	SEQ ID NO: 1195	9	2.0	50525.0	51790.5	51794.4

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:243	anti-hHER2-HC-H433-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N434	SEQ ID NO: 1196	5	2.0	50525.0	51790.5	51793.6 51922.4 ^g 51735.6
SEQ ID NO:244	anti-hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	SEQ ID NO: 1197	20	2.0	50525.0	51790.5	51797.6 51923.6 ^g
SEQ ID NO:246	anti-hHER2-HC-L443-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S444	SEQ ID NO: 1198	24	0.0	50525.0	51790.5	50527.2 50547.1
SEQ ID NO:248	anti-hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	SEQ ID NO: 1199	10	2.0	50525.0	51790.5	51786.8 51915.6 ^g 51729.6
SEQ ID NO:249	anti-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	SEQ ID NO: 1200	18	1.5	50331.8	51597.3	51598.4 51618.3
SEQ ID NO:250	anti-hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	SEQ ID NO: 1201	15	1.6	50331.8	51597.3	51602.4
SEQ ID NO:251	anti-hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	SEQ ID NO: 1202	27	2.0	50331.8	51597.3	51600.8
SEQ ID NO:257	anti-hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	SEQ ID NO: 1203	19	2.0	50331.8	51597.3	51603.2
SEQ ID NO:259	anti-hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	SEQ ID NO: 1204	21	2.0	50331.8	51597.3	51601.6
SEQ ID NO:261	anti-hHER2-HC-P153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V154	SEQ ID NO: 1205	15	0.1	50331.8	51597.3	50339.6
SEQ ID NO:262	anti-hHER2-HC-N159-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S160	SEQ ID NO: 1206	13	n.d. ^h	50331.8	51597.3	50334.4 51600.4
SEQ ID NO:265	anti-hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	SEQ ID NO: 1207	16	1.7	50331.8	51597.3	51598.3 51618.5

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:267	anti-hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	SEQ ID NO: 1208	18	1.2	50331.8	51597.3	51597.7 51616.8
SEQ ID NO:268	anti-hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	SEQ ID NO: 1209	23	1.9	50331.8	51597.3	51595.2
SEQ ID NO:269	anti-hHER2-HC-P171-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A172	SEQ ID NO: 1210	15	1.0	50331.8	51597.3	50332.9 50353.8
SEQ ID NO:270	anti-hHER2-HC-S176-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S177	SEQ ID NO: 1211	13	0.1	50331.8	51597.3	50333.0 50354.0
SEQ ID NO:273	anti-hHER2-HC-S190-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S191	SEQ ID NO: 1212	23	0.2	50331.8	51597.3	50333.6 51600.8
SEQ ID NO:274	anti-hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	SEQ ID NO: 1213	24	1.6	50331.8	51597.3	51598.9 51620.3
SEQ ID NO:275	anti-hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	SEQ ID NO: 1214	21	2.0	50331.8	51597.3	51598.4 51618.8
SEQ ID NO:277	anti-hHER2-HC-G194-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	SEQ ID NO: 1215	14	1.6	50331.8	51597.3	51599.2
SEQ ID NO:278	anti-hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	SEQ ID NO: 1216	14	1.9	50331.8	51597.3	51599.0 51617.2
SEQ ID NO:279	anti-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T197	SEQ ID NO: 1217	21	2.0	50331.8	51597.3	51598.1 51618.7
SEQ ID NO:280	anti-hHER2-HC-K205-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P206	SEQ ID NO: 1218	24	0.0	50331.8	51597.3	50327.6
SEQ ID NO:281	anti-hHER2-HC-P206-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S207	SEQ ID NO: 1219	23	0.0	50331.8	51597.3	50333.3 50354.7
SEQ ID NO:286	anti-hHER2-HC-E233-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L234	SEQ ID NO: 1220	28	0.6	50331.8	51597.3	50330.8 51596.6 51615.6

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:288	anti-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	SEQ ID NO: 1221	24	2.0	50331.8	51597.3	51596.7 51617.5
SEQ ID NO:289	anti-hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G237	SEQ ID NO: 1222	22	1.3	50331.8	51597.3	51598.8 51620.7
SEQ ID NO:290	anti-hHER2-HC-P244-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P245	SEQ ID NO: 1223	8	1.4	50331.8	51597.3	51596.8 51614.6
SEQ ID NO:291	anti-hHER2-HC-P245-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K246	SEQ ID NO: 1224	22	1.0	50331.8	51597.3	50330.6 51595.9 50351.5
SEQ ID NO:292	anti-hHER2-HC-I253-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S254	SEQ ID NO: 1225	0	N/A	50331.8	51597.3	N/A
SEQ ID NO:293	anti-hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	SEQ ID NO: 1226	24	1.9	50331.8	51597.3	51596.6 51616.8
SEQ ID NO:294	anti-hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	SEQ ID NO: 1227	21	2.0	50331.8	51597.3	51596.3 51616.5
SEQ ID NO:296	anti-hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E258	SEQ ID NO: 1228	22	1.9	50331.8	51597.3	51596.3 51616.1
SEQ ID NO:297	anti-hHER2-HC-S267-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-H268	SEQ ID NO: 1229	23	0.2	50331.8	51597.3	51596.0 50330.9 51615.6
SEQ ID NO:298	anti-hHER2-HC-H268-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E269	SEQ ID NO: 1230	22	0.7	50331.8	51597.3	51596.2 50331.0 51616.8
SEQ ID NO:299	anti-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	SEQ ID NO: 1231	17	1.8	50331.8	51597.3	51598.7 51620.0
SEQ ID NO:300	anti-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	SEQ ID NO: 1232	26	1.3	50331.8	51597.3	51596.4 51616.5
SEQ ID NO:301	anti-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	SEQ ID NO: 1233	22	1.7	50331.8	51597.3	51595.9 51615.4

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:302	anti-hHER2-HC-D280-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G281	SEQ ID NO: 1234	4	0.7	50331.8	51597.3	50330.8 51596.3 50351.7
SEQ ID NO:303	anti-hHER2-HC-H285-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N286	SEQ ID NO: 1235	25	0.0	50331.8	51597.3	50331.0 50352.7
SEQ ID NO:304	anti-hHER2-HC-N286-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A287	SEQ ID NO: 1236	20	0.0	50331.8	51597.3	50332.0 50354.1
SEQ ID NO:305	anti-hHER2-HC-P291-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R292	SEQ ID NO: 1237	21	0.5	50331.8	51597.3	50333.5 51598.8 51620.0
SEQ ID NO:310	anti-hHER2-HC-N315-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G316	SEQ ID NO: 1238	15	n.d.	50331.8	51597.3	50331.5 51596.8 50353.1
SEQ ID NO:311	anti-hHER2-HC-G316-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K317	SEQ ID NO: 1239	9	1.1	50331.8	51597.3	51596.6 50331.0 51614.0
SEQ ID NO:312	anti-hHER2-HC-K317-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E318	SEQ ID NO: 1240	10	0.8	50331.8	51597.3	50330.9 51596.3 50352.1
SEQ ID NO:313	anti-hHER2-HC-K326-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A327	SEQ ID NO: 1241	15	0.0	50331.8	51597.3	50330.8 51597.2
SEQ ID NO:314	anti-hHER2-HC-A327-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L328	SEQ ID NO: 1242	25	0.1	50331.8	51597.3	50333.6 50355.1
SEQ ID NO:315	anti-hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	SEQ ID NO: 1243	13	1.9	50331.8	51597.3	51598.8
SEQ ID NO:316	anti-hHER2-HC-P329-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A330	SEQ ID NO: 1244	7	0.9	50331.8	51597.3	51601.6 50334.8
SEQ ID NO:317	anti-hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	SEQ ID NO: 1245	25	1.8	50331.8	51597.3	51602.4
SEQ ID NO:318	anti-hHER2-HC-A339-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K340	SEQ ID NO: 1246	25	0.0	50331.8	51597.3	50333.6

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:319	anti-hHER2-HC-K340-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G341	SEQ ID NO: 1247	27	0.4	50331.8	51597.3	51600.4 50333.2
SEQ ID NO:320	anti-hHER2-HC-G341-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q342	SEQ ID NO: 1248	25	0.2	50331.8	51597.3	51599.9 50334.7
SEQ ID NO:321	anti-hHER2-HC-Q342-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P343	SEQ ID NO: 1249	28	0.8	50331.8	51597.3	51599.8 50334.5
SEQ ID NO:322	anti-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	SEQ ID NO: 1250	24	1.9	50331.8	51597.3	51599.1 51615.8
SEQ ID NO:323	anti-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	SEQ ID NO: 1251	29	1.9	50331.8	51597.3	51600.1 51616.6
SEQ ID NO:325	anti-hHER2-HC-E356-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E357	SEQ ID NO: 1252	20	0.8	50331.8	51597.3	51600.8 50335.1 51616.8
SEQ ID NO:327	anti-hHER2-HC-M358-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T359	SEQ ID NO: 1253	26	0.2	50331.8	51597.3	50333.9 51599.4
SEQ ID NO:328	anti-hHER2-HC-K360-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N361	SEQ ID NO: 1254	24	0.6	50331.8	51597.3	51599.9 51615.1
SEQ ID NO:329	anti-hHER2-HC-N384-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G385	SEQ ID NO: 1255	24	0.0	50331.8	51597.3	50334.3 50354.2
SEQ ID NO:129	anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	SEQ ID NO: 1122	21	1.9	50331.8	51597.3	51601.2
SEQ ID NO:330	anti-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N390	SEQ ID NO: 1256	25	1.6	50331.8	51597.3	51600.1 51620.9
SEQ ID NO:332	anti-hHER2-HC-P395-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P396	SEQ ID NO: 1257	25	0.0	50331.8	51597.3	50334.4 50352.8
SEQ ID NO:333	anti-hHER2-HC-D399-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S400	SEQ ID NO: 1258	11	0.0	50331.8	51597.3	50335.1 50353.6

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:335	anti-hHER2-HC-D401-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G402	SEQ ID NO: 1259	23	0.0	50331.8	51597.3	50334.9 50353.0
SEQ ID NO:336	anti-hHER2-HC-S415-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R416	SEQ ID NO: 1260	21	0.2	50331.8	51597.3	50335.0 51600.5
SEQ ID NO:337	anti-hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	SEQ ID NO: 1261	15	1.9	50331.8	51597.3	51599.9 51615.8
SEQ ID NO:338	anti-hHER2-HC-W417-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q418	SEQ ID NO: 1262	9	0.2	50331.8	51597.3	50334.8 51599.9 50353.4
SEQ ID NO:339	anti-hHER2-HC-Q418-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q419	SEQ ID NO: 1263	22	0.5	50331.8	51597.3	51600.5 50335.2 51616.7
SEQ ID NO:340	anti-hHER2-HC-Q419-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G420	SEQ ID NO: 1264	21	0.8	50331.8	51597.3	51600.0 51616.5
SEQ ID NO:341	anti-hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N421	SEQ ID NO: 1265	22	1.1	50331.8	51597.3	51599.5 51616.0
SEQ ID NO:342	anti-hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	SEQ ID NO: 1266	24	1.4	50331.8	51597.3	51600.6 51614.9
SEQ ID NO:343	anti-hHER2-HC-H433-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N434	SEQ ID NO: 1267	26	0.0	50331.8	51597.3	50334.7 50276.2
SEQ ID NO:344	anti-hHER2-HC-N434-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-H435	SEQ ID NO: 1268	25	0.6	50331.8	51597.3	51592.4 50326.8 50268.8
SEQ ID NO:346	anti-hHER2-HC-L443-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S444	SEQ ID NO: 1269	26	0.0	50331.8	51597.3	50334.5 50275.8 50353.4
SEQ ID NO:349	anti-hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	SEQ ID NO: 1270	29	1.8	50331.8	51597.3	51595.2

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ NO:31	ID anti-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-V110	SEQ ID NO: 1271	34	1.4	24811.6	26077.1	26077.8 26058.3 26096.4
SEQ NO:32	ID anti-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-A111	SEQ ID NO: 1272	5	1.9	24811.6	26077.1	26076.4
SEQ NO:33	ID anti-hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-A112	SEQ ID NO: 1273	13	2.0	24811.6	26077.1	26075.6
SEQ NO:34	ID anti-hHER2-LC-P119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-P120	SEQ ID NO: 1274	1	N/A	24811.6	26077.1	N/A
SEQ NO:37	ID anti-hHER2-LC-D122-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-E123	SEQ ID NO: 1275	1	N/A	24811.6	26077.1	N/A
SEQ NO:38	ID anti-hHER2-LC-Y140-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-P141	SEQ ID NO: 1276	3	0.8	24811.6	26077.1	26077.2
SEQ NO:39	ID anti-hHER2-LC-P141-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-R142	SEQ ID NO: 1277	3	0.3	24811.6	26077.1	26076.8
SEQ NO:40	ID anti-hHER2-LC-R142-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-E143	SEQ ID NO: 1278	5	0.3	24811.6	26077.1	26077.7 24811.8 26097.2
SEQ NO:41	ID anti-hHER2-LC-E143-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-A144	SEQ ID NO: 1279	6	0.4	24811.6	26077.1	26075.6 26097.6
SEQ NO:42	ID anti-hHER2-LC-D151-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-N152	SEQ ID NO: 1280	16	0.3	24811.6	26077.1	24811.7 26077.3 24829.7

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ NO:43	ID anti-hHER2-LC-N152-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-A153	SEQ ID NO: 1281	5	1.0	24811.6	26077.1	26077.2
SEQ NO:44	ID anti-hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-L154	SEQ ID NO: 1282	13	1.9	24811.6	26077.1	26077.7 26096.6
SEQ NO:45	ID anti-hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-Q155	SEQ ID NO: 1283	21	1.2	24811.6	26077.1	26078.2 26096.9
SEQ NO:46	ID anti-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-S156	SEQ ID NO: 1284	14	2.0	24811.6	26077.1	26075.2
SEQ NO:47	ID anti-hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-S162	SEQ ID NO: 1285	19	1.9	24811.6	26077.1	26077.6 26097.6
SEQ NO:48	ID anti-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-V163	SEQ ID NO: 1286	17	0.7	24811.6	26077.1	26077.2
SEQ NO:50	ID anti-hHER2-LC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-E165	SEQ ID NO: 1287	14	0.0	24811.6	26077.1	24810.0
SEQ NO:51	ID anti-hHER2-LC-E165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-Q166	SEQ ID NO: 1288	0	N/A	24811.6	26077.1	N/A
SEQ NO:52	ID anti-hHER2-LC-Q166-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-D167	SEQ ID NO: 1289	17	0.0	24811.6	26077.1	24810.4 24832.4
SEQ NO:53	ID anti-hHER2-LC-D167-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLN-S168	SEQ ID NO: 1290	24	0.7	24811.6	26077.1	26077.4 24812.3 26096.5

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ NO:54	ID anti-hHER2-LC-T197-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H198	SEQ ID NO: 1291	8	1.2	24811.6	26077.1	24812.0 26077.9 24831.4
SEQ NO:56	ID anti-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	SEQ ID NO: 1292	5	1.9	24811.6	26077.1	26076.0
SEQ NO:59	ID anti-hHER2-LC-S202-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S203	SEQ ID NO: 1293	8	2.0	24811.6	26077.1	26077.4 26095.9
SEQ NO:63	ID anti-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	SEQ ID NO: 1294	15	2.0	24618.4	25883.9	25883.2
SEQ NO:64	ID anti-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	SEQ ID NO: 1295	17	1.6	24618.4	25883.9	25881.2
SEQ NO:65	ID anti-hHER2-LC-P119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P120	SEQ ID NO: 1296	13	0.0	24618.4	25883.9	24618.1 24637.6
SEQ NO:66	ID anti-hHER2-LC-P120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S121	SEQ ID NO: 1297	9	0.0	24618.4	25883.9	24617.2
SEQ NO:67	ID anti-hHER2-LC-S121-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D122	SEQ ID NO: 1298	4	0.0	24618.4	25883.9	24616.8
SEQ NO:68	ID anti-hHER2-LC-D122-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E123	SEQ ID NO: 1299	2	0.0	24618.4	25883.9	24616.8
SEQ NO:69	ID anti-hHER2-LC-Y140-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P141	SEQ ID NO: 1300	5	0.1	24618.4	25883.9	24616.4
SEQ NO:71	ID anti-hHER2-LC-R142-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E143	SEQ ID NO: 1301	13	0.1	24618.4	25883.9	24618.8 25884.0 24639.3
SEQ NO:72	ID anti-hHER2-LC-E143-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A144	SEQ ID NO: 1302	10	0.0	24618.4	25883.9	24616.8

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ NO:73	ID anti-hHER2-LC-D151-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N152	SEQ ID NO: 1303	17	0.0	24618.4	25883.9	24617.2
SEQ NO:74	ID anti-hHER2-LC-N152-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A153	SEQ ID NO: 1304	17	0.0	24618.4	25883.9	24616.8
SEQ NO:75	ID anti-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	SEQ ID NO: 1305	20	1.8	24618.4	25883.9	25882.8
SEQ NO:76	ID anti-hHER2-LC-L154-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q155	SEQ ID NO: 1306	25	0.6	24618.4	25883.9	25884.6 24618.9 25904.2
SEQ NO:77	ID anti-hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	SEQ ID NO: 1307	27	1.1	24618.4	25883.9	25883.9 24619.0 25903.2
SEQ NO:79	ID anti-hHER2-LC-S162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V163	SEQ ID NO: 1308	7	0.0	24618.4	25883.9	24616.4
SEQ NO:81	ID anti-hHER2-LC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E165	SEQ ID NO: 1309	10	0.0	24618.4	25883.9	24616.4
SEQ NO:82	ID anti-hHER2-LC-E165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q166	SEQ ID NO: 1310	29	0.0	24618.4	25883.9	24618.9 24639.4
SEQ NO:83	ID anti-hHER2-LC-Q166-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D167	SEQ ID NO: 1311	20	0.0	24618.4	25883.9	24617.2
SEQ NO:84	ID anti-hHER2-LC-D167-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S168	SEQ ID NO: 1312	28	0.0	24618.4	25883.9	24618.8 24639.0
SEQ NO:85	ID anti-hHER2-LC-T197-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-H198	SEQ ID NO: 1313	5	0.0	24618.4	25883.9	24615.2
SEQ NO:87	ID anti-hHER2-LC-Q199-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G200	SEQ ID NO: 1314	7	0.0	24618.4	25883.9	24617.2
SEQ NO:88	ID anti-hHER2-LC-G200-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L201	SEQ ID NO: 1315	18	0.2	24618.4	25883.9	24618.8 25884.4 24638.9

SEQ ID de anticuerpo	Nombre ^a de ADC	SEQ ID NO de ADC	Anticuerpo (mg/L)	DAR ^c	Masa esperada anticuerpo ^d (Da)	Masa esperada ADC ^e (Da)	Masa observada ^f (Da)
SEQ ID NO:89	anti-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	SEQ ID NO: 1316	15	0.8	24618.4	25883.9	25884.0

^a Nombre representa parte de la HC o LC que contiene la etiqueta peptídica con el compuesto unido, no estando en la lista la cadena tipo silvestre pareada.

^b Rendimiento de anticuerpo por litro de cultivo (con base en 35 mL de cultivo) medido después de la purificación con proteína A.

^c Relación fármaco a anticuerpo de acuerdo con HPLC.

^d Masa in Daltons según predicción para el anticuerpo.

^e Masa in Daltons según predicción para ADC.

^f Masa in Daltons según detección en el instrumento Agilent 6520 Q-TOF (Agilent Technologies). La observación más prominente va primero en la lista.

^g La masa observada corresponde a residuo de lisina en terminal C no protegido de la cadena pesada.

n.d., no determinada. La relación fármaco a anticuerpo no pudo ser determinada con exactitud por HPLC por la superposición de picos.

N/A, no aplicable. No se intentó la conjugación o no se pudieron obtener los datos debido al bajo rendimiento.

Ejemplo 26. Escalamiento de ADCs marcados con péptidos seleccionados para estudios farmacocinéticos (PK) y caracterización adicional

El sistema PEPP no proporciona cantidades suficientes de ADC marcados con péptidos para los estudios de PK. Posteriormente, la expresión de 97 constructos (Tabla 22) seleccionados de entre los 183 anticuerpos analizados en el Ejemplo 25 (Tabla 21) se amplió hasta 200-1000 mL de volumen de cultivo. Los criterios de selección para el aumento de escala fueron una alta eficacia de conjugación, un rendimiento de expresión razonable, una potencia in vitro confirmada y un bajo nivel de agregación como se observó para los ADC preparados en el Ejemplo 25.

Después de la expresión de los anticuerpos marcados con S6/ybbR seleccionados en el medio de expresión Freestyle™ (Invitrogen) durante cinco días a 37°C bajo 5% de CO₂, los cultivos se recogieron mediante centrifugación y los sobrenadantes del medio resultantes se pasaron a través de filtros de 0.22 µm (EMD Millipore). La expresión del anticuerpo se verificó mediante análisis SDS-PAGE. A continuación, los filtrados se cargaron a una rata de flujo de 0.5-1 mL/min en columnas equilibradas con PBS que contenían 0.5 mL de resina de Proteína A utilizando una bomba peristáltica MINIPULS Evolution (Gilson Inc.). Después de lavar las columnas con 100-200 volúmenes de columna de PBS, los constructos de anticuerpo se eluyeron con acetato de sodio 0.1 M (pH 3.0) en dos fracciones de 2.5 mL. Ambas fracciones se neutralizaron inmediatamente con un 25-38% (v/v) de regulador Tris-HCl (1 M, pH 8.0). Para determinar el rendimiento de los anticuerpos purificados con proteína A (Tabla 22), las concentraciones de proteína de los eluidos se midieron por duplicado en un espectrofotómetro UV-Vis ND-1000 (NanoDrop Technologies) a 280 nm de acuerdo con el coeficiente de extinción molar preestablecido para las moléculas de IgG. Usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (corte de 3.5 - 7.0 kDa, Pierce), la segunda fracción de elución de cada construcción se dializó en PBS para mediciones de termoestabilidad posteriores de anticuerpos no conjugados mediante DSF (Tabla 23). La primera fracción de elución de cada anticuerpo marcado con péptido se dializó en regulador de conjugación (regulador Tris-HCl 75 mM a pH 8.0 complementado con NaCl 20 mM y MgCl₂ 12.5 mM). Después de ajustar la concentración de anticuerpo a 2.5 µM, las reacciones de conjugación se iniciaron mediante la adición de CoA-MC-MMAF y enzima Sfp a concentraciones finales de 30-60 µM y 1-4 µM, respectivamente. La reacción enzimática se dejó proceder durante aproximadamente 16-20 horas a temperatura ambiente, antes de verificar el grado de marcación mediante HPLC analítica en fase reversa utilizando el anticuerpo no acoplado respectivo como control (Tabla 22). Todas las reacciones de conjugación se analizaron por espectrometría de masas en un instrumento Agilent 6520 Q-TOF (Tabla 22). Después de confirmar la conjugación casi cuantitativa, las mezclas de reacción se concentraron hasta un volumen final de 1 mL utilizando dispositivos de filtro centrífugo Amicon Ultra de 30 kDa (EMD Millipore). Después de la eliminación del precipitado por centrifugación, la enzima Sfp y el exceso de sustrato de CoA-MC-MMAF se eliminaron mediante SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) en una columna de grado de preparación HiLoad 26/60

Superdex 200 (GE Healthcare) en PBS a una rata de flujo de 1 mL/min. La pureza de los ADC marcados con péptidos después de la SEC se evaluó mediante HPLC de fase inversa. Después de una filtración de 0.22 µm, los rendimientos finales de los ADC se determinaron utilizando mediciones por triplicado en un espectrofotómetro ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies) como se muestra anteriormente (Tabla 22).

Tabla 22. Producción y caracterización de ADC a partir de 200-1000 mL de cultivo a escala.

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:151	anti-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	SEQ ID NO: 1137	57	31	2.0	97	51790.5	51786.4
SEQ ID NO:152	anti-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	SEQ ID NO: 1138	40	23	2.0	100	51790.5	51796.4
SEQ ID NO:157	anti-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	SEQ ID NO: 1139	41	20	2.0	100	51790.5	51785.2
SEQ ID NO:158	anti-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	SEQ ID NO: 1140	40	20	2.0	100	51790.5	51785.6
SEQ ID NO:166	anti-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	SEQ ID NO: 1147	25	16	2.0	100	51790.5	51791.6
SEQ ID NO:168	anti-hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	SEQ ID NO: 1148	32	15	2.0	100	51790.5	51787.6
SEQ ID NO:169	anti-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	SEQ ID NO: 1149	39	21	2.0	100	51790.5	51786.4

ES 2 703 540 T3

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:173	anti-hHER2-HC- P189-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- S190	SEQ ID NO: 1152	36	25	2.0	100	51790.5	51792.0
SEQ ID NO:178	anti-hHER2-HC- G194-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- T195	SEQ ID NO: 1156	35	21	2.0	100	51790.5	51794.8
SEQ ID NO:179	anti-hHER2-HC- T195-GDS-ppan- MC-MMAF- LSWLLRLLN- Q196	SEQ ID NO: 1157	39	21	1.9	100	51790.5	51790.4
SEQ ID NO:202	anti-hHER2-HC- P271-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- E272	SEQ ID NO: 1172	9	4	1.9	100	51790.5	51782.0
SEQ ID NO:218	anti-hHER2-HC- A330-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- P331	SEQ ID NO: 1181	30	14	1.8	100	51790.5	51796.4 50526.8 ^h
SEQ ID NO:220	anti-hHER2-HC- K340-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- G341	SEQ ID NO: 1182	20	9	2.0	100	51790.5	51794.4 51918.4 ⁱ
SEQ ID NO:221	anti-hHER2-HC- G341-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- Q342	SEQ ID NO: 1183	47	26	1.9	100	51790.5	51794.8
SEQ ID NO:224	anti-hHER2-HC- R344-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- E345	SEQ ID NO: 1186	37	21	2.0	100	51790.5	51795.6

ES 2 703 540 T3

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:229	anti-hHER2-HC- K360-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- N361	SEQ ID NO: 1187	46	21	1.9	100	51790.5	51785.2
SEQ ID NO:127	anti-hHER2-HC- E388-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- N389	SEQ ID NO: 1118	40	25	2.0	100	51790.5	51792.4
SEQ ID NO:239	anti-hHER2-HC- Q418-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- Q419	SEQ ID NO: 1195	55	26	2.0	100	51790.5	51786.8 51914.4 ⁱ
SEQ ID NO:244	anti-hHER2-HC- N434-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- H435	SEQ ID NO: 1197	41	10	1.9	n.d.	51790.5	51785.2 51912.8 ⁱ
SEQ ID NO:248	anti-hHER2-HC- P445-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- G446	SEQ ID NO: 1199	9	3	1.9	100	51790.5	51783.2 51910.8 ⁱ
SEQ ID NO:250	anti-hHER2-HC- S119-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- T120	SEQ ID NO: 1201	35	25	1.9	100	51597.3	51591.2
SEQ ID NO:251	anti-hHER2-HC- T120-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- K121	SEQ ID NO: 1202	42	24	1.9	100	51597.3	51592.4
SEQ ID NO:257	anti-hHER2-HC- S136-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA-137	SEQ ID NO: 1203	33	20	1.9	100	51597.3	51602.0

ES 2 703 540 T3

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:259	anti-hHER2-HC- G138-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- T139	SEQ ID NO: 1204	26	14	1.9	100	51597.3	51592.0
SEQ ID NO:268	anti-hHER2-HC- S165-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- G166	SEQ ID NO: 1209	33	21	1.9	100	51597.3	51595.2
SEQ ID NO:277	anti-hHER2-HC- G194-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- T195	SEQ ID NO: 1215	24	14	1.9	100	51597.3	51592.4
SEQ ID NO:315	anti-hHER2-HC- L328-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- P329	SEQ ID NO: 1243	35	22	1.9	100	51597.3	51600.4
SEQ ID NO:317	anti-hHER2-HC- A330-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- P331	SEQ ID NO: 1245	20	12	1.8	100	51597.3	51589.2 50323.6 ^h
SEQ ID NO:129	anti-hHER2-HC- E388-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- N389	SEQ ID NO: 1122	51	28	1.9	100	51597.3	51592.0
SEQ ID NO:349	anti-hHER2-HC- G446-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- K447	SEQ ID NO: 1270	37	23	1.9	100	51597.3	51590.4
SEQ ID NO:32	anti-hHER2-LC- V110-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- A111	SEQ ID NO: 1272	8	3	2.0	93	26077.1	26074.8

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:33	anti-hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A112	SEQ ID NO: 1273	20	13	2.0	100	26077.1	26073.6
SEQ ID NO:46	anti-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	SEQ ID NO: 1284	29	19	1.9	100	26077.1	26070.8
SEQ ID NO:48	anti-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	SEQ ID NO: 1251	9	5	1.9	100	26077.1	26076.0
SEQ ID NO:56	anti-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	SEQ ID NO: 1292	10	3	1.9	100	26077.1	26074.4
SEQ ID NO:63	anti-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	SEQ ID NO: 1294	53	30	1.9	100	25883.9	25880.8
SEQ ID NO:64	anti-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	SEQ ID NO: 1295	12	8	1.9	100	25883.9	25880.4 25901.2 ^j
SEQ ID NO:75	anti-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	SEQ ID NO: 1305	14	7	1.9	100	25883.9	25878.0
SEQ ID NO:89	anti-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	SEQ ID NO: 1316	26	15	1.8	100	25883.9	25881.2

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:330	anti-hHER2-HC- N389-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- N390	SEQ ID NO: 1256	23	14	1.9	100	51597.3	51592.7
SEQ ID NO:195	anti-hHER2-HC- R255-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- T256	SEQ ID NO: 1167	20	7	2.0	100	51790.5	51786.1 51727.9 ^k
SEQ ID NO:206	anti-hHER2-HC- P291-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- R292	SEQ ID NO: 1173	28	16	1.9	100	51790.5	51786.8
SEQ ID NO:288	anti-hHER2-HC- L235-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- G236	SEQ ID NO: 1221	28	18	2.0	100	51597.3	51593.9 50407.9 ^l
SEQ ID NO:249	anti-hHER2-HC- A118-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- S119	SEQ ID NO: 1200	24	15	1.9	100	51597.3	51595.9
SEQ ID NO:323	anti-hHER2-HC- R344-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- E345	SEQ ID NO: 1251	23	13	1.9	100	51597.3	51594.6
SEQ ID NO:322	anti-hHER2-HC- P343-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- R344	SEQ ID NO: 1250	24	15	1.9	100	51597.3	51594.6
SEQ ID NO:301	anti-hHER2-HC- P271-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- E272	SEQ ID NO: 1233	21	13	1.9	100	51597.3	51594.1

ES 2 703 540 T3

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:279	anti-hHER2-HC- Q196-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- T197	SEQ ID NO: 1217	12	7	1.9	100	51597.3	51595.9
SEQ ID NO:293	anti-hHER2-HC- S254-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- R255	SEQ ID NO: 1226	19	11	2.0	100	51597.3	51595.3
SEQ ID NO:194	anti-hHER2-HC- S254-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- R255	SEQ ID NO: 1166	23	3	2.0	n.d.	51790.5	51788.3 51597.3 ^j 51729.3 ^k
SEQ ID NO:337	anti-hHER2-HC- R416-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- W417	SEQ ID NO: 1261	22	10	2.0	100	51597.3	51595.0 51537.0 ^k
SEQ ID NO:201	anti-hHER2-HC- D270-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- P271	SEQ ID NO: 1171	17	9	2.0	100	51790.5	51788.7
SEQ ID NO:265	anti-hHER2-HC- A162-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- L163	SEQ ID NO: 1207	20	14	1.9	100	51597.3	51596.6
SEQ ID NO:274	anti-hHER2-HC- S191-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- S192	SEQ ID NO: 1213	22	12	2.0	100	51597.3	51596.9
SEQ ID NO:275	anti-hHER2-HC- S192-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- L193	SEQ ID NO: 1214	22	14	2.0	100	51597.3	51597.0

ES 2 703 540 T3

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:177	anti-hHER2-HC- L193-GDS-ppan- MC-MMAF- LSWLLRLLN- G194	SEQ ID NO: 1155	18	10	2.0	100	51790.5	51790.8
SEQ ID NO:294	anti-hHER2-HC- R255-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- T256	SEQ ID NO: 1227	12	7	2.0	100	51597.3	51595.0 51536.9 ^k
SEQ ID NO:199	anti-hHER2-HC- H268-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- E269	SEQ ID NO: 1169	13	6	2.0	100	51790.5	51789.1
SEQ ID NO:198	anti-hHER2-HC- S267-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- H268	SEQ ID NO: 1168	9	5	2.0	100	51790.5	51788.7
SEQ ID NO:189	anti-hHER2-HC- L235-GDS-ppan- MC-MMAF- LSWLLRLLN- G236	SEQ ID NO: 1163	9	4	2.0	100	51790.5	51789.6
SEQ ID NO:223	anti-hHER2-HC- P343-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- R344	SEQ ID NO: 1185	15	6	2.0	100	51790.5	51789.2
SEQ ID NO:193	anti-hHER2-HC- 1253-GDS-ppan- MC-MMAF- LSWLLRLLN- S254	SEQ ID NO: 1165	7	3	1.9	100	51790.5	51788.9 51729.9 ^k
SEQ ID NO:182	anti-hHER2-HC- P206-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- S207	SEQ ID NO: 1160	30	15	1.9	100	51790.5	51790.1

ES 2 703 540 T3

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:296	anti-hHER2-HC- P257-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- E258	SEQ ID NO: 1228	10	5	2.0	100	51597.3	51595.2
SEQ ID NO:278	anti-hHER2-HC- T195-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- Q196	SEQ ID NO: 1216	12	6	2.0	100	51597.3	51597.3
SEQ ID NO:299	anti-hHER2-HC- E269-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- D270	SEQ ID NO: 1231	9	5	1.9	100	51597.3	51595.7
SEQ ID NO:150	anti-hHER2-HC- A118-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- S119	SEQ ID NO: 1136	10	4	2.0	100	51790.5	51792.2
SEQ ID NO:185	anti-hHER2-HC- A231-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- P232	SEQ ID NO: 1161	27	12	2.0	100	51790.5	51789.6
SEQ ID NO:47	anti-hHER2-LC- E161-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- S162	SEQ ID NO: 1285	23	15	2.0	100	26077.1	26076.5 25457.3 ⁱ
SEQ ID NO:91	anti-hHER2-LC- S203-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- P204	SEQ ID NO: 1317	15	8	1.9	100	25883.9	25883.5 28925.4 ⁱ
SEQ ID NO:60	anti-hHER2-LC- S203-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- P204	SEQ ID NO: 1318	15	6	2.0	100	26077.1	26076.7

ES 2 703 540 T3

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:61	anti-hHER2-LC- K207-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- S208	SEQ ID NO: 1319	9	4	1.9	100	26077.1	26076.7
SEQ ID NO:90	anti-hHER2-LC- S202-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- S203	SEQ ID NO: 1320	22	13	1.9	100	25883.9	25883.6
SEQ ID NO:44	anti-hHER2-LC- A153-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- L154	SEQ ID NO: 1282	30	22	2.0	100	26077.1	26075.7 25456.0 ⁱ
SEQ ID NO:267	anti-hHER2-HC- T164-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- S165	SEQ ID NO: 1208	25	19	2.0	100	51597.3	51597.0
SEQ ID NO:176	anti-hHER2-HC- S192-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- L193	SEQ ID NO: 1154	15	8	2.0	100	51790.5	51791.2
SEQ ID NO:300	anti-hHER2-HC- D270-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- P271	SEQ ID NO: 1232	33	26	1.9	100	51597.3	51595.2
SEQ ID NO:180	anti-hHER2-HC- Q196-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- T197	SEQ ID NO: 1158	27	17	2.0	100	51790.5	51787.2
SEQ ID NO:175	anti-hHER2-HC- S191-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- S192	SEQ ID NO: 1153	43	23	2.0	100	51790.5	51791.5

ES 2 703 540 T3

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:341	anti-hHER2-HC- G420-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- N421	SEQ ID NO: 1265	42	33	2.0	100	51597.3	51595.0
SEQ ID NO:289	anti-hHER2-HC- G236-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- G237	SEQ ID NO: 1222	49	38	1.9	100	51597.3	51595.2 50408.8 ⁱ
SEQ ID NO:342	anti-hHER2-HC- N421-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- V422	SEQ ID NO: 1266	39	31	2.0	100	51597.3	51596.7 51725.6 ⁱ
SEQ ID NO:77	anti-hHER2-LC- Q155-DS-ppan- MC-MMAF- LEFIASKLA- S156	SEQ ID NO: 1307	45	35	1.9	100	25883.9	25883.0 28925.2 ⁱ
SEQ ID NO:45	anti-hHER2-LC- L154-GDS-ppan- MC-MMAF- LSWLLRLLN- Q155	SEQ ID NO: 1283	35	27	2.0	100	26077.1	26076.8 28925.2 ^j
SEQ ID NO:237	anti-hHER2-HC- R416-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- W417	SEQ ID NO: 1193	8	4	2.0	81	51790.5	51790.9 51917.9 ⁱ
SEQ ID NO:187	anti-hHER2-HC- E233-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- L234	SEQ ID NO: 1162	4	1	2.0	100	51790.5	51790.0
SEQ ID NO:160	anti-hHER2-HC- G138-GDS- ppan-MC- MMAF- LSWLLRLLN- T139	SEQ ID NO: 1141	17	12	2.0	100	51790.5	51790.1

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:370	anti-hHER2-HC- G161-GDS- ppan-MC- MMAF- LDMLEWSLM- A162	SEQ ID NO: 1321	18	9	1.9	100	51800.5	51798.3 50533.6 ^h
SEQ ID NO:372	anti-hHER2-HC- L163-GDS-ppan- MC-MMAF- LDMLEWSLM- T164	SEQ ID NO: 1322	22	10	1.5	100	51800.5	51799.0 50533.8 ^h
SEQ ID NO:374	anti-hHER2-HC- S165-GDS- ppan-MC- MMAF- LDMLEWSLM- G166	SEQ ID NO: 1323	23	10	1.9	100	51800.5	51799.2
SEQ ID NO:376	anti-hHER2-HC- S190-GDS- ppan-MC- MMAF- LDMLEWSLM- S191	SEQ ID NO: 1324	8	4	1.8	100	51800.5	51799.3 50534.1 ^h
SEQ ID NO:377	anti-hHER2-HC- S191-GDS- ppan-MC- MMAF- LDMLEWSLM- S192	SEQ ID NO: 1325	14	7	1.9	100	51800.5	51799.2
SEQ ID NO:378	anti-hHER2-HC- S192-GDS- ppan-MC- MMAF- LDMLEWSLM- L193	SEQ ID NO: 1326	11	5	1.9	100	51800.5	51799.2
SEQ ID NO:380	anti-hHER2-HC- G194-GDS- ppan-MC- MMAF- LDMLEWSLM- T195	SEQ ID NO: 1327	16	9	1.9	100	51800.5	51799.0
SEQ ID NO:381	anti-hHER2-HC- T195-GDS-ppan- MC-MMAF- LDMLEWSLM- Q196	SEQ ID NO: 1328	25	10	1.9	100	51800.5	51799.2

SEQ ID Anticuerpo	Nombre ^a de ADC	ADC SEQ ID NO	Rendimiento anticuerpo ^b (mg/L)	Rendimiento ADC ^c (mg/L)	DAR ^d	Monómero (%)	Masa esperada ^f (Da)	Masa observada ^g (Da)
SEQ ID NO:383	anti-hHER2-LC- T109-GDS-ppan- MC-MMAF- LDMLEWSLM- V110	SEQ ID NO: 1329	27	10	1.9	100	26087.1	26085.8 28924.5 ^j
SEQ ID NO:384	anti-hHER2-LC- V110-GDS- ppan-MC- MMAF- LDMLEWSLM- A111	SEQ ID NO: 1330	27	10	1.9	100	26087.1	26086.0 28924.7 ^j

^a Nombre representa parte de la HC o LC que contiene la etiqueta peptídica con el compuesto unido, no estando en la lista la cadena tipo silvestre pareada.

^b Rendimiento de anticuerpo por litro de cultivo (con base en 35 mL de cultivo) medido después de la purificación con proteína A.

^c Rendimiento de ADC por litro de cultivo después de cromatografía de exclusión por tamaño

^d Relación fármaco a anticuerpo de acuerdo con HPLC.

^e Resultados analíticos de cromatografía de exclusión por tamaño para ADC (porcentaje de monómero)

^f Masa in Daltons según predicción para ADC.

^g Masa in Daltons según detección en el instrumento Agilent 6520 Q-TOF (Agilent Technologies). La observación más prominente va primero en la lista.

^h La masa observada corresponde a anticuerpo no conjugado.

ⁱ La masa observada corresponde a residuo de lisina en terminal C no protegido de la cadena pesada.

^j La masa observada presumiblemente corresponde a aducto de sodio.

^k La masa observada corresponde a residuo Gly446 no protegido de cadena pesada.

^l La masa observada corresponde a una especie desconocida de baja abundancia.

^j Pico de arrastre.

n.d., no determinada.

Los niveles de expresión de los anticuerpos marcados con péptido seleccionados promediaron 25 mg por litro de cultivo celular (con un rango de 4 a 57 mg/L) (Tabla 22) y el rendimiento final de ADC purificado promedió 14 mg por litro de cultivo celular (variando de 1 a 38 mg/L) (Tabla 22). Todos los ADC se conjugaron específicamente en el sitio con dos moléculas de CoA-MC-MMAF a un DAR promedio de 1.9 (DAR que varía de 1.5 a 2.0) según lo verificado por HPLC y MS (Tabla 22). No se detectaron agregaciones ni especies oligoméricas para 92 de los 97 ADC preparados (Tabla 22). Todos los demás ADC fueron al menos 81% monoméricos según lo determinado por cromatografía de exclusión de tamaño analítica (sin datos para dos ADC). La estabilidad térmica de los anticuerpos no conjugados y los ADC se caracterizó por DSF (Tabla 23). Para el trastuzumab de tipo salvaje, se observaron dos transiciones de fusión térmica DSF (Tm1 y Tm2) a 69.7 y 81.2°C. Para 28 de los 97 anticuerpos marcados con péptidos, ambas transiciones estuvieron a menos de 3°C de lo que se observó para el trastuzumab de tipo salvaje. La conjugación de CoA-MC-MMAF redujo la Tm1 del ADC en un promedio de 1.2°C y la Tm2 del ADC en un promedio de 0.6°C en relación con el anticuerpo no conjugado (Tabla 23). Para 37 anticuerpos (y ADCs), la estabilidad térmica se redujo significativamente (>3 grados C) en relación con el trastuzumab de tipo salvaje, como lo ilustra la diferencia en Tm1. Esta transición se atribuye al despliegue del dominio CH2 (residuos de aminoácidos 228-340) de una IgG y, de hecho, la mayoría de los anticuerpos que están desestabilizados tienen la etiqueta del péptido insertada en las posiciones en

el dominio CH2. Específicamente, la gráfica de la Figura 18 ilustra que las inserciones de etiquetas peptídicas en el dominio CH2 generalmente conducen a valores Tm1 más bajos que los de las respectivas inserciones de etiquetas peptídicas en los dominios CH1 y CH3 adyacentes de la cadena pesada. Como se indicó anteriormente, la ubicación de la etiqueta peptídica puede afectar significativamente las propiedades del anticuerpo resultante y el ADC.

5 Tabla 23. Estabilidad térmica de anticuerpos modificados y ADC según lo determinado por fluorometría de barrido diferencial (DSF).

SEQ ID de anticuerpo:	Nombre ^a de	ADC SEQ ID NO	Anticuerpo Tm1 (°C)	Anticuerpo Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	$\Delta Tm1^b$ (°C)	$\Delta Tm2^b$ (°C)	Ab-WT $\Delta Tm1^c$ (°C)
SEQ ID NO:151	anti-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	SEQ ID NO: 1137	69.8	t.b.	69.2	t.b.	-0.6	t.b.	0.1
SEQ ID NO:152	anti-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	SEQ ID NO: 1138	69.1	t.b.	68.8	t.b.	-0.3	t.b.	-0.6
SEQ ID NO:157	anti-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	SEQ ID NO: 1139	67.6	81.3	67.1	81.2	-0.5	-0.1	-2.1
SEQ ID NO:158	anti-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	SEQ ID NO: 1140	67.9	81.3	67.3	81.3	-0.6	0	-1.8
SEQ ID NO:166	anti-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	SEQ ID NO: 1147	69.3	80.0	68.9	79.8	-0.3	-0.2	-0.4
SEQ ID NO:168	anti-hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	SEQ ID NO: 1148	68.9	80.4	68.8	80.5	-0.2	0.1	-0.8
SEQ ID NO:169	anti-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	SEQ ID NO: 1149	69.2	80.4	68.8	80.2	-0.4	-0.2	-0.5
SEQ ID NO:173	anti-hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S190	SEQ ID NO: 1152	69.0	80.5	68.3	80.4	-0.7	-0.2	-0.7
SEQ ID NO:178	anti-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T195	SEQ ID NO: 1156	68.7	80.8	67.6	80.9	-1.1	0.1	-1.0

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo:	Nombre ^a de	ADC SEQ ID NO	Anticuerpo Tm1 (°C)	Anticuerpo Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	$\Delta Tm1^b$ (°C)	$\Delta Tm2^b$ (°C)	Ab-WT $\Delta Tm1^c$ (°C)
SEQ ID NO:179	anti-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	SEQ ID NO: 1157	69.3	81.1	68.8	80.9	-0.5	-0.1	-0.4
SEQ ID NO:202	anti-hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	SEQ ID NO: 1172	53.4	81.6	51.2	81.2	-2.2	-0.4	-16.3
SEQ ID NO:218	anti-hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P331	SEQ ID NO: 1181	52.5	81.5	49.0	81.1	-3.5	-0.3	-17.2
SEQ ID NO:220	anti-hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G341	SEQ ID NO: 1182	65.2	77.3	58.7	81.0	-6.5	3.7	-4.5
SEQ ID NO:221	anti-hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q342	SEQ ID NO: 1183	65.0	76.9	56.0	81.0	-9	4.2	-4.7
SEQ ID NO:224	anti-hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E345	SEQ ID NO: 1186	58.6	81.4	57.7	81.2	-0.9	-0.2	-11.1
SEQ ID NO:229	anti-hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	SEQ ID NO: 1187	70.1	81.7	68.8	81.4	-1.3	-0.3	0.4
SEQ ID NO:127	anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	SEQ ID NO: 1118	66.4	81.3	66.2	80.9	-0.2	-0.4	-3.3
SEQ ID NO:239	anti-hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	SEQ ID NO: 1195	69.0	81.0	68.3	81.1	-0.7	0.1	-0.7
SEQ ID NO:244	anti-hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	SEQ ID NO: 1197	60.5	81.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-9.2
SEQ ID NO:248	anti-hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	SEQ ID NO: 1199	71.8	81.0	69.9	80.5	-1.8	-0.5	2.1

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo:	Nombre ^a de	ADC SEQ ID NO	Anticuerpo Tm1 (°C)	Anticuerpo Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	$\Delta Tm1^b$ (°C)	$\Delta Tm2^b$ (°C)	Ab-WT $\Delta Tm1^c$ (°C)
SEQ ID NO:250	anti-hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	SEQ ID NO: 1201	70.1	t.b.	71.2	t.b.	1	t.b.	0.4
SEQ ID NO:251	anti-hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	SEQ ID NO: 1202	70.4	t.b.	70.4	t.b.	0	t.b.	0.7
SEQ ID NO:257	anti-hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	SEQ ID NO: 1203	69.3	80.8	68.3	81.0	-1.1	0.2	-0.4
SEQ ID NO:259	anti-hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	SEQ ID NO: 1204	69.3	80.9	68.5	81.2	-0.7	0.2	-0.4
SEQ ID NO:268	anti-hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	SEQ ID NO: 1209	69.6	80.3	69.2	80.5	-0.4	0.1	-0.1
SEQ ID NO:277	anti-hHER2-HC-G194-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	SEQ ID NO: 1215	69.3	81.1	68.5	80.9	-0.9	-0.1	-0.4
SEQ ID NO:315	anti-hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	SEQ ID NO: 1243	56.9	78.8	50.4	81.0	-6.5	2.1	-12.8
SEQ ID NO:317	anti-hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	SEQ ID NO: 1245	54.2	81.1	51.3	81.2	-2.9	0.1	-15.5
SEQ ID NO:129	anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	SEQ ID NO: 1122	69.3	81.5	68.8	81.0	-0.6	-0.5	-0.4
SEQ ID NO:349	anti-hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	SEQ ID NO: 1270	69.9	81.2	69.9	80.9	0	-0.4	0.2
SEQ ID NO:32	anti-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A111	SEQ ID NO: 1272	66.9	t.b.	66.3	t.b.	-0.6	t.b.	-2.8

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo:	Nombre ^a de	ADC SEQ ID NO	Anticuerpo Tm1 (°C)	Anticuerpo Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	$\Delta Tm1^b$ (°C)	$\Delta Tm2^b$ (°C)	Ab-WT $\Delta Tm1^c$ (°C)
SEQ NO:33	ID anti-hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A112	SEQ ID NO: 1273	67.3	t.b.	66.0	t.b.	-1.3	t.b.	-2.4
SEQ NO:46	ID anti-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	SEQ ID NO: 1284	69.4	80.0	68.7	79.4	-0.7	-0.6	-0.3
SEQ NO:48	ID anti-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	SEQ ID NO: 1251	68.5	t.b.	67.3	t.b.	-1.2	t.b.	-1.2
SEQ NO:56	ID anti-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	SEQ ID NO: 1292	67.5	t.b.	67.4	t.b.	-0.1	t.b.	-2.2
SEQ NO:63	ID anti-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	SEQ ID NO: 1294	69.0	t.b.	67.6	t.b.	-1.4	t.b.	-0.7
SEQ NO:64	ID anti-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	SEQ ID NO: 1295	69.6	t.b.	68.5	t.b.	-1.1	t.b.	-0.1
SEQ NO:75	ID anti-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	SEQ ID NO: 1305	69.6	79.7	69.0	79.2	-0.5	-0.5	-0.1
SEQ NO:89	ID anti-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	SEQ ID NO: 1316	69.5	75.1	68.7	74.8	-0.8	-0.4	-0.2
SEQ NO:330	ID anti-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N390	SEQ ID NO: 1256	67.8	79.1	67.3	78.7	-0.5	-0.5	-1.9
SEQ NO:195	ID anti-hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	SEQ ID NO: 1167	52.0	76.9	49.7	78.6	-2.3	1.7	-17.7
SEQ NO:206	ID anti-hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	SEQ ID NO: 1173	56.0	77.3	65.4	77.9	9.4	0.6	-13.7

SEQ ID de anticuerpo:	Nombre ^a de	ADC SEQ ID NO	Anticuerpo Tm1 (°C)	Anticuerpo Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	$\Delta Tm1^b$ (°C)	$\Delta Tm2^b$ (°C)	Ab-WT $\Delta Tm1^c$ (°C)
SEQ ID NO:288	anti-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	SEQ ID NO: 1221	64.1	79.4	63.5	78.9	-0.6	-0.5	-5.6
SEQ ID NO:249	anti-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	SEQ ID NO: 1200	68.1	t.b.	67.8	t.b.	-0.3	t.b.	-1.6
SEQ ID NO:323	anti-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	SEQ ID NO: 1251	60.5	79.2	58.4	78.6	-2.1	-0.5	-9.2
SEQ ID NO:322	anti-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	SEQ ID NO: 1250	59.5	79.2	57.6	78.7	-1.8	-0.5	-10.2
SEQ ID NO:301	anti-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	SEQ ID NO: 1233	53.0	79.8	49.8	78.0	-3.1	-1.8	-16.7
SEQ ID NO:279	anti-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T197	SEQ ID NO: 1217	68.2	77.3	68.2	77.3	0.0	0.0	-1.5
SEQ ID NO:293	anti-hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	SEQ ID NO: 1226	57.9	79.2	53.3	78.5	-4.5	-0.7	-11.8
SEQ ID NO:194	anti-hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	SEQ ID NO: 1166	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:337	anti-hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	SEQ ID NO: 1261	67.5	78.8	66.8	78.5	-0.8	-0.3	-2.2
SEQ ID NO:201	anti-hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	SEQ ID NO: 1171	67.7	75.9	43.9	77.7	-23.8	1.8	-2.0
SEQ ID NO:265	anti-hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	SEQ ID NO: 1207	69.0	78.2	68.1	76.4	-0.9	-1.7	-0.7

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo:	Nombre ^a de	ADC SEQ ID NO	Anticuerpo Tm1 (°C)	Anticuerpo Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	$\Delta Tm1^b$ (°C)	$\Delta Tm2^b$ (°C)	Ab-WT $\Delta Tm1^c$ (°C)
SEQ ID NO:274	anti-hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	SEQ ID NO: 1213	68.3	77.8	66.8	74.9	-1.5	-2.9	-1.4
SEQ ID NO:275	anti-hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	SEQ ID NO: 1214	68.4	78.1	66.9	76.1	-1.4	-1.9	-1.3
SEQ ID NO:177	anti-hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G194	SEQ ID NO: 1155	68.0	77.1	66.7	75.9	-1.3	-1.2	-1.7
SEQ ID NO:294	anti-hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	SEQ ID NO: 1227	58.4	79.3	54.4	78.7	-4.1	-0.5	-11.3
SEQ ID NO:199	anti-hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	SEQ ID NO: 1169	49.8	78.9	48.1	77.6	-1.6	-1.3	-19.9
SEQ ID NO:198	anti-hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	SEQ ID NO: 1168	49.1	78.9	47.4	78.0	-1.7	-0.9	-20.6
SEQ ID NO:189	anti-hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	SEQ ID NO: 1163	61.1	79.3	62.3	79.1	1.2	-0.2	-8.6
SEQ ID NO:223	anti-hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R344	SEQ ID NO: 1185	56.9	79.0	55.3	78.4	-1.5	-0.6	-12.9
SEQ ID NO:193	anti-hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	SEQ ID NO: 1165	50.3	79.0	46.2	78.7	-4.1	-0.3	-19.4
SEQ ID NO:182	anti-hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	SEQ ID NO: 1160	58.8	63.4	56.1	61.9	-2.7	-1.6	-10.9
SEQ ID NO:296	anti-hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E258	SEQ ID NO: 1228	59.9	75.9	66.8	74.8	6.9	-1.2	-9.8

SEQ ID de anticuerpo:	Nombre ^a de	ADC SEQ ID NO	Anticuerpo Tm1 (°C)	Anticuerpo Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	$\Delta Tm1^b$ (°C)	$\Delta Tm2^b$ (°C)	Ab-WT $\Delta Tm1^c$ (°C)
SEQ ID NO:278	anti-hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	SEQ ID NO: 1216	68.4	77.7	66.8	75.5	-1.6	-2.2	-1.3
SEQ ID NO:299	anti-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	SEQ ID NO: 1231	53.9	79.4	69.4	t.b.	15.5	t.b.	-15.8
SEQ ID NO:150	anti-hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	SEQ ID NO: 1136	70.0	t.b.	64.6	79.0	-5.3	t.b.	0.3
SEQ ID NO:185	anti-hHER2-HC-A231-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	SEQ ID NO: 1161	60.4	79.2	69.0	75.1	8.6	-4.1	-9.3
SEQ ID NO:47	anti-hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	SEQ ID NO: 1285	70.1	75.8	67.4	t.b.	-2.7	t.b.	0.4
SEQ ID NO:91	anti-hHER2-LC-S203-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P204	SEQ ID NO: 1317	68.9	74.0	66.4	t.b.	-2.5	t.b.	-0.8
SEQ ID NO:60	anti-hHER2-LC-S203-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P204	SEQ ID NO: 1318	66.6	t.b.	65.4	t.b.	-1.3	t.b.	-3.1
SEQ ID NO:61	anti-hHER2-LC-K207-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S208	SEQ ID NO: 1319	65.4	t.b.	62.8	t.b.	-2.6	t.b.	-4.3
SEQ ID NO:90	anti-hHER2-LC-S202-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S203	SEQ ID NO: 1320	68.6	t.b.	66.9	t.b.	-1.8	t.b.	-1.1
SEQ ID NO:44	anti-hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	SEQ ID NO: 1282		77.8	66.7	76.1		-1.6	
SEQ ID NO:267	anti-hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	SEQ ID NO: 1208	69.0	78.3	68.1	77.4	-0.9	-1.0	-0.7

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo:	Nombre ^a de	ADC SEQ ID NO	Anticuerpo Tm1 (°C)	Anticuerpo Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	$\Delta Tm1^b$ (°C)	$\Delta Tm2^b$ (°C)	Ab-WT $\Delta Tm1^c$ (°C)
SEQ ID NO:176	anti-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	SEQ ID NO: 1154	66.4	77.9	65.5	74.6	-0.9	-3.3	-3.3
SEQ ID NO:300	anti-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	SEQ ID NO: 1232	53.7	79.6	51.3	77.9	-2.4	-1.7	-16.0
SEQ ID NO:180	anti-hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	SEQ ID NO: 1158	66.5	75.9	65.5	73.9	-0.9	-2.0	-3.3
SEQ ID NO:175	anti-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	SEQ ID NO: 1153	66.3	77.2	65.7	77.1	-0.6	-0.1	-3.4
SEQ ID NO:341	anti-hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N421	SEQ ID NO: 1265	67.9	78.9	67.3	78.4	-0.6	-0.6	-1.8
SEQ ID NO:289	anti-hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G237	SEQ ID NO: 1222	66.2	79.3	63.1	78.8	-3.1	-0.5	-3.5
SEQ ID NO:342	anti-hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	SEQ ID NO: 1266	68.9	t.b.	68.1	77.4	-0.7	t.b.	-0.9
SEQ ID NO:77	anti-hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	SEQ ID NO: 1307	69.3	77.1	68.3	76.0	-1.0	-1.2	-0.4
SEQ ID NO:45	anti-hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q155	SEQ ID NO: 1283	68.9	77.2	67.6	75.9	-1.2	-1.3	-0.9
SEQ ID NO:237	anti-hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	SEQ ID NO: 1193	63.4	78.9	66.7	78.4	3.3	-0.6	-6.3
SEQ ID NO:187	anti-hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	SEQ ID NO: 1162	44.9	78.5	44.0	77.7	-0.9	-0.8	-24.8

ES 2 703 540 T3

SEQ ID de anticuerpo:	Nombre ^a de	ADC SEQ ID NO	Anticuerpo Tm1 (°C)	Anticuerpo Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	$\Delta Tm1^b$ (°C)	$\Delta Tm2^b$ (°C)	Ab-WT $\Delta Tm1^c$ (°C)
SEQ ID NO:160	anti-hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T139	SEQ ID NO: 1141	67.1	78.8	66.6	78.1	-0.5	-0.7	-2.6
SEQ ID NO:370	anti-hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A162	SEQ ID NO: 1321	68.9	78.2	67.7	75.9	-1.1	-2.3	-0.8
SEQ ID NO:372	anti-hHER2-HC-L163-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T164	SEQ ID NO: 1322	69.0	78.4	68.3	77.5	-0.8	-0.9	-0.7
SEQ ID NO:374	anti-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-G166	SEQ ID NO: 1323	69.1	78.7	68.1	77.5	-1.0	-1.3	-0.6
SEQ ID NO:376	anti-hHER2-HC-S190-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S191	SEQ ID NO: 1324	68.0	78.0	66.6	76.6	-1.4	-1.5	-1.7
SEQ ID NO:377	anti-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S192	SEQ ID NO: 1325	68.0	78.1	66.5	76.2	-1.5	-2.0	-1.7
SEQ ID NO:378	anti-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-L193	SEQ ID NO: 1326	68.1	78.4	66.7	76.4	-1.4	-1.9	-1.6
SEQ ID NO:380	anti-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T195	SEQ ID NO: 1327	68.3	78.4	66.9	76.7	-1.4	-1.7	-1.4
SEQ ID NO:381	anti-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-Q196	SEQ ID NO: 1328	68.3	77.9	66.9	75.8	-1.4	-2.1	-1.4
SEQ ID NO:383	anti-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-V110	SEQ ID NO: 1329	66.5	t.b.	64.3	t.b.	-2.2	t.b.	-3.2
SEQ ID NO:384	anti-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A111	SEQ ID NO: 1330	66.1	t.b.	63.8	t.b.	-2.3	t.b.	-3.6

SEQ ID de anticuerpo:	Nombre ^a de	ADC SEQ ID NO	Anticuerpo Tm1 (°C)	Anticuerpo Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	$\Delta Tm1^b$ (°C)	$\Delta Tm2^b$ (°C)	Ab-WT $\Delta Tm1^c$ (°C)
^a Nombre representa parte de la HC o LC que contiene la etiqueta peptídica con el compuesto unido, no estando en la lista la cadena tipo silvestre pareada. ^b Tm de ADC menos Tm de anticuerpo. ^c Tm1 de anticuerpo de trastuzumab tipo silvestre (69.7°C). n.d. No determinado. La medición no se llevó a cabo debido a cantidades de muestra insuficientes. t.b., Transición demasiado amplia para determinación de Tm2 con exactitud.									

Los ADC purificados se caracterizaron además por su potencia *in vitro* contra líneas celulares seleccionadas (Tabla 24) que incluyen dos líneas celulares diseñadas, el clon 16 MDA-MB231 y el clon 40, y dos líneas celulares (JimT1 y HCC1954) que expresan endógenamente el antígeno objetivo, HER2 humano, en la superficie celular. Las células del clon 16 de MDA-MB231 expresan de manera estable ~500,000 copias de HER2 por célula, mientras que el clon 40 expresa solo ~5000 copias/celda. Las células HCC1954 expresan endógenamente un alto nivel (~500.000 copias/célula) de HER2 humano en la superficie (Clinchy B, Gazdar A, Rabinovsky R, Yefenof E, Gordon B, Vitetta ES. Breast Cancer Res Treat. (2000) 61: 217-228). La línea celular JimT1 expresa aproximadamente 80.000 copias de HER2 por célula (Mocanu M-M, Fazekas Z, Petrás M, Nagy P, Sebestyén Z, Isola J, Tímár J, Park JW, Vereb G, Szöllösi J. Cancer Letters (2005) 227: 201-212). Los ensayos de proliferación celular se realizaron con Cell-Titer-Glo™ (Promega) cinco días después de que las células se incubaran con diversas concentraciones de ADC (Riss et al., (2004) Assay Drug Dev Technol. 2: 51-62) con un análisis automático. (Melnick et al., (2006) Proc Natl Acad Sci U S A. 103: 3153-3158). Los ADC MMAF marcados con péptido trastuzumab destruyeron específicamente el clon 16 MDA-MB231, las células HCC1954 y JimT1 (Tabla 24): los valores IC₅₀ de los ADC MMAF marcados con péptido trastuzumab promediaron alrededor de 0.45 nM, 0.24 nM y 2.0 nM para el MDA-MB231 clon 16, células HCC1954 y JimT1, respectivamente (Tabla 24), consistentes con los diferentes niveles de expresión de HER2. No se observó muerte del antígeno negativo (Her2 bajo) de la línea celular de control MDA-MB231 clon 40 a la concentración de prueba más alta (33 nM) para 92 de 97 ADC.

Tabla 24. Potencia *in vitro* de ADC anti-HER2. Se informaron concentraciones de destrucción de células IC₅₀ para líneas celulares positivas y negativas para HER2.

SEQ ID anticuerpo	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC ₅₀ (μM) ^b	JimT1 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 16 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 40 IC ₅₀ (μM) ^b
SEQ ID NO:151	anti-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	SEQ ID NO: 1137	1.94E-04	5.10E-04	6.82E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:152	anti-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	SEQ ID NO: 1138	1.69E-04	7.53E-04	7.02E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:157	anti-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	SEQ ID NO: 1139	1.36E-04	2.57E-04	3.10E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:158	anti-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	SEQ ID NO: 1140	1.64E-04	2.43E-04	3.05E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:166	anti-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	SEQ ID NO: 1147	1.55E-04	8.66E-04	3.31E-04	> 3.33E-02

SEQ ID anticuerpo	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC ₅₀ (μM) ^b	JimT1 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 16 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 40 IC ₅₀ (μM) ^b
SEQ ID NO:168	anti-hHER2-HC-T164-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-S165	SEQ ID NO: 1148	1.89E-04	5.36E-04	4.69E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:169	anti-hHER2-HC-S165-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-G166	SEQ ID NO: 1149	1.69E-04	6.19E-04	4.00E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:173	anti-hHER2-HC-P189-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-S190	SEQ ID NO: 1152	1.47E-04	2.69E-04	2.86E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:178	anti-hHER2-HC-G194-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-T195	SEQ ID NO: 1156	1.03E-04	1.33E-03	3.56E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:179	anti-hHER2-HC-T195-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-Q196	SEQ ID NO: 1157	1.42E-04	3.00E-04	2.79E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:202	anti-hHER2-HC-P271-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-E272	SEQ ID NO: 1172	1.33E-04	4.50E-04	6.75E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:218	anti-hHER2-HC-A330-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-P331	SEQ ID NO: 1181	9.68E-05	3.18E-04	4.66E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:220	anti-hHER2-HC-K340-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-G341	SEQ ID NO: 1182	3.76E-04	5.55E-04	3.08E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:221	anti-hHER2-HC-G341-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-Q342	SEQ ID NO: 1183	7.21E-05	3.58E-04	7.82E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:224	anti-hHER2-HC-R344-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-E345	SEQ ID NO: 1186	2.13E-03	4.47E-04	3.21E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:229	anti-hHER2-HC-K360-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-N361	SEQ ID NO: 1187	1.80E-04	1.31E-03	7.57E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:127	anti-hHER2-HC-E388-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-N389	SEQ ID NO: 1118	1.57E-04	4.21E-04	5.42E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:239	anti-hHER2-HC-Q418-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-Q419	SEQ ID NO: 1195	2.48E-04	1.24E-03	7.31E-04	> 3.33E-02

SEQ ID anticuerpo	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC ₅₀ (μM) ^b	JimT1 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 16 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 40 IC ₅₀ (μM) ^b
SEQ ID NO:244	anti-h HER2-HC-N434-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-H435	SEQ ID NO: 1197	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:248	anti-hHER2-HC-P445-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-G446	SEQ ID NO: 1199	7.42E-05	3.84E-03	7.44E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:250	anti-hHER2-HC-S119-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- T120	SEQ ID NO: 1201	1.80E-04	3.46E-04	3.21 E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:251	anti-hHER2-HC-T120-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- K121	SEQ ID NO: 1202	1.98E-04	4.59E-04	3.94E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:257	anti-hHER2-HC-S136-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- 137	SEQ ID NO: 1203	6.48E-05	3.95E-04	2.62E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:259	anti-hHER2-HC-G138-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- T139	SEQ ID NO: 1204	1.58E-04	> 3.33E- 02	3.21E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:268	anti-hHER2-HC-S165-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- G166	SEQ ID NO: 1209	1.65E-04	4.07E-04	3.79E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:277	anti-hHER2-HC-G194-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- T195	SEQ ID NO: 1215	1.22E-04	6.48E-04	1.83E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:315	anti-hHER2-HC-L328-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- P329	SEQ ID NO: 1243	1.37E-04	2.79E-04	1.15E-03	> 3.33E-02
SEQ ID NO:317	anti-hHER2-HC-A330-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- P331	SEQ ID NO: 1245	4.09E-04	2.24E-02	2.85E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:129	anti-hHER2-HC-E388-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- N389	SEQ ID NO: 1122	2.26E-04	1.83E-03	3.12E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:349	anti-hHER2-HC-G446-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- K447	SEQ ID NO: 1270	2.12E-04	6.82E-04	7.77E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:32	anti-hHER2-LC-V110-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-A111	SEQ ID NO: 1272	2.31E-04	4.14E-04	5.18E-04	> 3.33E-02

SEQ ID anticuerpo	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC ₅₀ (μM) ^b	JimT1 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 16 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 40 IC ₅₀ (μM) ^b
SEQ ID NO:33	anti-hHER2-LC-A111-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-A112	SEQ ID NO: 1273	1.95E-04	1.15E-02	5.05E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:46	anti-hHER2-LC-Q155-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-S156	SEQ ID NO: 1284	1.43E-04	5.47E-04	3.70E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:48	anti-hHER2-LC-S162-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-V163	SEQ ID NO: 1251	2.67E-04	8.13E-04	7.14E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:56	anti-hHER2-LC-Q199-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-G200	SEQ ID NO: 1292	1.92E-04	9.21E-04	4.77E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:63	anti-hHER2-LC-V110-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- A111	SEQ ID NO: 1294	3.97E-04	4.62E-04	2.77E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:64	anti-hHER2-LC-A111-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- A112	SEQ ID NO: 1295	1.59E-04	6.32E-04	1.68E-02	> 3.33E-02
SEQ ID NO:75	anti-hHER2-LC-A153-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- L154	SEQ ID NO: 1305	1.80E-04	2.03E-02	2.60E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:89	anti-hHER2-LC-L201-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- S202	SEQ ID NO: 1316	4.25E-04	3.86E-04	4.74E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:330	anti-hHER2-HC-N389-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- N390	SEQ ID NO: 1256	2.32E-04	4.93E-04	2.26E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:195	anti-hHER2-HC-R255-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-T256	SEQ ID NO: 1167	2.06E-04	3.67E-04	1.16E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:206	anti-hHER2-HC-P291-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-R292	SEQ ID NO: 1173	1.99E-04	3.04E-04	9.74E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:288	anti-hHER2-HC-L235-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- G236	SEQ ID NO: 1221	1.90E-04	2.97E-04	6.48E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:249	anti-hHER2-HC-A118-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- S119	SEQ ID NO: 1200	2.41E-04	3.39E-04	1.97E-04	> 3.33E-02

SEQ ID anticuerpo	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC ₅₀ (μM) ^b	JimT1 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 16 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 40 IC ₅₀ (μM) ^b
SEQ ID NO:323	anti-hHER2-HC-R344-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- E345	SEQ ID NO: 1251	2.31E-04	3.39E-04	6.45E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:322	anti-hHER2-HC-P343-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- R344	SEQ ID NO: 1250	2.40E-04	3.75E-04	7.55E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:301	anti-hHER2-HC-P271-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- E272	SEQ ID NO: 1233	2.21E-04	3.78E-04	7.46E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:279	anti-hHER2-HC-Q196-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- T197	SEQ ID NO: 1217	2.44E-04	4.28E-04	1.13E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:293	anti-hHER2-HC-S254-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- R255	SEQ ID NO: 1226	1.92E-04	5.49E-04	6.43E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:194	anti-h H ER2-HC-S254-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-R255	SEQ ID NO: 1166	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:337	anti-hHER2-HC-R416-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- W417	SEQ ID NO: 1261	2.69E-04	7.57E-04	8.06E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:201	anti-h H ER2-HC-D270-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-P271	SEQ ID NO: 1171	2.28E-04	3.41E-04	8.89E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:265	anti-hHER2-HC-A162-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- L163	SEQ ID NO: 1207	2.27E-04	3.42E-04	1.24E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:274	anti-hHER2-HC-S191-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- S192	SEQ ID NO: 1213	2.39E-04	3.21E-04	1.49E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:275	anti-hHER2-HC-S192-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- L193	SEQ ID NO: 1214	2.30E-04	3.37E-04	1.47E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:177	anti-hHER2-HC-L193-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-G194	SEQ ID NO: 1155	2.10E-04	3.03E-04	7.99E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:294	anti-hHER2-HC-R255-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- T256	SEQ ID NO: 1227	2.06E-04	4.33E-04	4.40E-05	> 3.33E-02

SEQ ID anticuerpo	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC ₅₀ (μM) ^b	JimT1 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 16 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 40 IC ₅₀ (μM) ^b
SEQ ID NO:199	anti-h HER2-HC-H268-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-E269	SEQ ID NO: 1169	2.26E-04	3.79E-04	8.97E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:198	anti-hHER2-HC-S267-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-H268	SEQ ID NO: 1168	2.30E-04	3.68E-04	8.13E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:189	anti-hHER2-HC-L235-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-G236	SEQ ID NO: 1163	2.43E-04	3.09E-04	1.44E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:223	anti-hHER2-HC-P343-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-R344	SEQ ID NO: 1185	2.27E-04	3.88E-04	6.27E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:193	anti-hHER2-HC-1253-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-S254	SEQ ID NO: 1165	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:182	anti-hHER2-HC-P206-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-S207	SEQ ID NO: 1160	2.68E-04	9.11E-04	1.79E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:296	anti-hHER2-HC-P257-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- E258	SEQ ID NO: 1228	2.20E-04	5.53E-04	7.67E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:278	anti-hHER2-HC-T195-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- Q196	SEQ ID NO: 1216	1.91E-04	3.14E-04	1.31E-04	2.90E-02
SEQ ID NO:299	anti-hHER2-HC-E269-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- D270	SEQ ID NO: 1231	2.33E-04	3.97E-04	1.13E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:150	anti-hHER2-HC-A118-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-S119	SEQ ID NO: 1136	2.57E-04	6.74E-04	1.95E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:185	anti-hHER2-HC-A231-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-P232	SEQ ID NO: 1161	2.32E-04	2.70E-04	1.72E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:47	anti-hHER2-LC-E161-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-S162	SEQ ID NO: 1285	1.63E-04	2.74E-04	1.39E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:91	anti-hHER2-LC-S203-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- P204	SEQ ID NO: 1317	2.20E-04	3.33E-04	1.84E-04	> 3.33E-02

SEQ ID anticuerpo	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC ₅₀ (μM) ^b	JimT1 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 16 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 40 IC ₅₀ (μM) ^b
SEQ ID NO:60	anti-h HER2-LC-S203-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-P204	SEQ ID NO: 1318	2.32E-04	4.29E-04	1.28E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:61	anti-h HER2-LC-K207-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-S208	SEQ ID NO: 1319	2.23E-04	4.54E-04	1.78E-04	1.49E-02
SEQ ID NO:90	anti-hHER2-LC-S202-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- S203	SEQ ID NO: 1320	2.41E-04	4.33E-04	1.82E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:44	anti-hHER2-LC-A153-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-L154	SEQ ID NO: 1282	2.44E-04	3.95E-04	1.42E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:267	anti-hHER2-HC-T164-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- S165	SEQ ID NO: 1208	1.64E-04	3.00E-04	1.22E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:176	anti-hHER2-HC-S192-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-L193	SEQ ID NO: 1154	2.53E-04	3.41E-04	1.81E-04	3.25E-02
SEQ ID NO:300	anti-hHER2-HC-D270-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- P271	SEQ ID NO: 1232	2.47E-04	4.49E-04	1.87E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:180	anti-hHER2-HC-Q196-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-T197	SEQ ID NO: 1158	2.49E-04	2.69E-04	1.81E-04	2.26E-02
SEQ ID NO:175	anti-hHER2-HC-S191-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-S192	SEQ ID NO: 1153	2.35E-04	3.10E-04	1.81E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:341	anti-hHER2-HC-G420-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- N421	SEQ ID NO: 1265	2.47E-04	7.03E-04	1.56E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:289	anti-hHER2-HC-G236-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- G237	SEQ ID NO: 1222	2.37E-04	1.75E-03	1.30E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:342	anti-hHER2-HC-N421-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- V422	SEQ ID NO: 1266	2.47E-04	2.27E-02	1.59E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:77	anti-hHER2-LC-Q155-DS- ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA- S156	SEQ ID NO: 1307	2.21E-04	4.48E-04	1.70E-04	> 3.33E-02

SEQ ID anticuerpo	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC ₅₀ (μM) ^b	JimT1 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 16 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 40 IC ₅₀ (μM) ^b
SEQ ID NO:45	anti-hHER2-LC-L154-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-Q155	SEQ ID NO: 1283	2.48E-04	4.57E-04	1.26E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:237	anti-hHER2-HC-R416-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-W417	SEQ ID NO: 1193	6.68E-04	8.65E-04	2.69E-04	3.03E-02
SEQ ID NO:187	anti-hHER2-HC-E233-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-L234	SEQ ID NO: 1162	2.43E-04	4.47E-04	1.01E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:160	anti-hHER2-HC-G138-GDS- ppan-MC-MMAF- LSWLLRLLN-T139	SEQ ID NO: 1141	2.44E-04	3.16E-04	1.78E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:370	anti-hHER2-HC-G161-GDS- ppan-MC-MMAF- LDMLEWSLM-A162	SEQ ID NO: 1321	2.28E-04	3.48E-04	1.63E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:372	anti-hHER2-HC-L163-GDS- ppan-MC-MMAF- LDMLEWSLM-T164	SEQ ID NO: 1322	2.72E-04	> 3.33E- 02	2.21E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:374	anti-hHER2-HC-S165-GDS- ppan-MC-MMAF- LDMLEWSLM-G166	SEQ ID NO: 1323	2.54E-04	4.88E-04	1.95E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:376	anti-hHER2-HC-S190-GDS- ppan-MC-MMAF- LDMLEWSLM-S191	SEQ ID NO: 1324	2.58E-04	7.20E-04	1.69E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:377	anti-hHER2-HC-S191-GDS- ppan-MC-MMAF- LDMLEWSLM-S192	SEQ ID NO: 1325	2.45E-04	3.68E-04	1.84E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:378	anti-hHER2-HC-S192-GDS- ppan-MC-MMAF- LDMLEWSLM-L193	SEQ ID NO: 1326	2.58E-04	4.76E-04	1.57E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:380	anti-hHER2-HC-G194-GDS- ppan-MC-MMAF- LDMLEWSLM-T195	SEQ ID NO: 1327	2.51E-04	4.93E-04	1.67E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:381	anti-hHER2-HC-T195-GDS- ppan-MC-MMAF- LDMLEWSLM-Q196	SEQ ID NO: 1328	2.44E-04	4.39E-04	1.36E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:383	anti-hHER2-LC-T109-GDS- ppan-MC-MMAF- LDMLEWSLM-V110	SEQ ID NO: 1329	2.12E-04	3.19E-04	1.26E-04	> 3.33E-02

SEQ ID anticuerpo	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC ₅₀ (μM) ^b	JimT1 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 16 IC ₅₀ (μM) ^b	MDA-MB-231 clon 40 IC ₅₀ (μM) ^b
SEQ ID NO:384	anti-h HER2-LC-V110-GDS- ppan-MC-MMAF- LDMLEWSLM-A111	SEQ ID NO: 1330	2.24E-04	3.54E-04	1.60E-04	> 3.33E-02

^a Nombre representa parte de la HC o LC que contiene la etiqueta peptídica con el compuesto unido, no estando en la lista la cadena tipo silvestre pareada.

^b 33 nM fue la concentración más alta usada en el ensayo de mortalidad de células para IC₅₀.

n.d., no determinado.

Las buenas propiedades farmacocinéticas son esenciales para la eficacia *in vivo* de los ADC (Hamblett, et al., Clin Cancer Res., 10: 7063-7070 (2004); Alley et al., Bioconjug. Chem. 19: 759-765 (2008)). La conjugación de una molécula de CoA-MC-MMAF a un anticuerpo puede afectar negativamente a sus propiedades biofísicas, lo que resulta en una rápida eliminación y reduce dramáticamente la eficacia *in vivo* del correspondiente ADC (Hamblett et al., 2004). Para evaluar los efectos del sitio de conjugación en la eliminación *in vivo* y la estabilidad *in vivo* de ADC, se realizaron estudios farmacocinéticos (PK) en ratones que no portaban tumores con 86 ADC de trastuzumab marcados con péptidos (Tabla 25).

Cada MMAF ADC marcado con péptido se inyectó por vía intravenosa en tres ratones a una dosis única de 1 mg/kg. Luego se recogieron nueve muestras de plasma durante 340 horas antes de que los títulos de plasma de los ADC se determinaran por ELISA. El ensayo ELISA utiliza el dominio extracelular inmovilizado de HER2 humano para capturar moléculas de ADC de trastuzumab de muestras de plasma. Después de la etapa de captura de este ensayo, se utiliza un anticuerpo anti-MMAF para medir exclusivamente la concentración plasmática del conjugado "intacto" trastuzumab MMAF. En un segundo experimento ELISA, un anticuerpo anti-hlgG genera una señal que indica la concentración en plasma de moléculas de trastuzumab conjugadas y no conjugadas. Si no se produce *in vivo* la desconjugación de la carga útil del ADC, se espera que tanto el ELISA anti-MMAF como el anti-hlgG proporcionen lecturas idénticas en la concentración plasmática de ADC. Sin embargo, en el caso de la pérdida de carga útil *in vivo*, se espera que el ELISA anti-MMAF produzca una señal más baja que el ELISA anti-hlgG. La comparación de ambas señales de ELISA, por lo tanto, permite la cuantificación de la desconjugación de la carga útil durante la exposición *in vivo* del respectivo ADC. La interpretación de los datos de PK se basa en curvas estándar que se generaron con los mismos ADC que se utilizan para la inyección intravenosa en ratones.

El área bajo la curva de concentración en plasma versus tiempo (AUC) es un parámetro farmacocinético importante que se puede usar para determinar la eliminación total y la biodisponibilidad del agente bioterapéutico administrado. Para cada MMAF ADC marcado con péptido, se obtuvieron dos valores de AUC característicos, AUC hlgG y AUC MMAF, mediante los experimentos ELISA anti-hlgG y anti-MMAF, respectivamente. La Tabla 25 resume los valores de AUC hlgG y AUC MMAF, así como sus respectivas relaciones de los 86 ADC marcados con péptidos probados. Los valores de hlgG AUC obtenidos se extienden a lo largo de un amplio rango, con el valor más alto de 32553 nM*hr, aproximadamente 30 veces más alto que el valor más bajo de 1362 nM*hr, con un promedio de 16935 nM*hr. La Figura 20 A-C ejemplifica curvas PK de tres ADC MMAF marcados con péptido que muestran valores altos de AUC hlgG (ADC de SEQ ID NO: 248, 28334 nM*hr; ADC de SEQ ID NO: 33, 21011 nM*hr; ADC de SEQ ID NO: 251, 21689 nM*hr). Por el contrario, las curvas PK de tres constructos que muestran valores bajos de AUC-hlgG (ADC de la SEQ ID NO: 218, 1362 nM*hr; ADC de la SEQ ID NO: 202, 1757 nM*hr; ADC de la SEQ ID NO: 244, 2378 nM*hr) se ilustran en la Figura 20 D-F. A pesar de la gran variación de los valores de AUC hlgG, los títulos de anti-hlgG y anti-MMAF se siguen entre sí, lo que sugiere que se produjo poca o ninguna anulación de la carga útil *in vivo*. Además, las proporciones entre los valores de AUC MMAF y AUC hlgG de los 86 ADCs marcados con péptidos probados promedian a 1.0 ± 0.1 (AUC(MMAF)/AUC(hlgG) $\pm$ desviación estándar, véase Tabla 25 y Figura 21), lo que sugiere que el enlace basado en maleimida entre el MC-MMAF y el tiol terminal de la unidad estructural 4'-fosfopanteteína (ppan) se mantuvo estable en circulación durante el transcurso del experimento PK. Asimismo, estos resultados también indican una alta estabilidad *in vivo* del enlace basado en fosfodiéster entre el grupo protésico ppan y el residuo de serina de la etiqueta del péptido S6/ybbR/A1 insertada.

La rápida eliminación observada para algunos de los ADC marcados con péptidos es probablemente el resultado de la inserción de una secuencia peptídica S6, A1 o ybbR en regiones específicas de la molécula de IgG1 en lugar de la unión del fármaco. La supuesta relación entre el sitio de inserción de la etiqueta y el perfil farmacocinético se ejemplifica mediante los dos ADC MMAF marcados con péptidos de la SEQ ID NO: 218 y la SEQ ID NO: 202, que muestran los valores de AUC hlgG más bajos y el tercero más bajo de 1362 nM*hr y 1757 nM*hr, respectivamente. Ambos ADC contienen inserciones de etiquetas S6 en el dominio CH2 de la cadena pesada. Además de la inestabilidad en la

circulación murina, estos ADC también exhiben las quintas termoestabilidades más bajas y novenas más bajas de las 86 muestras analizadas del estudio PK. De acuerdo con las mediciones de DSF, los ADC correspondientes muestran Tm1 de 49.0°C (ADC de la SEQ ID NO: 218) y 51.2°C (ADC de la SEQ ID NO: 202), lo que resulta en una disminución de 20.7°C y 18.5°C, respectivamente, en comparación con el trastuzumab de tipo salvaje que tiene un Tm1 de 69.7°C. En contraste, los cuarenta ADC con los valores más altos de AUC hlgG (19695 - 32553 nM*hr) muestran un valor Tm1 promedio de 67.4°C, que está solo 2.3°C por debajo del Tm1 de trastuzumab de tipo salvaje, lo que sugiere una posible correlación entre farmacocinética y termoestabilidad de los ADC. Además, 26 de estos cuarenta ADC contienen etiquetas S6, ybbR o A1 en regiones de bucle del dominio CH1 de la cadena pesada. Como se mencionó anteriormente, las inserciones de etiquetas peptídicas en estos sitios favorables también muestran las mejores eficiencias de conjugación en general, lo que las convierte en candidatas preferidas para la producción de ADC. Estos incluyen anticuerpos con inserciones de cadena pesada entre S119-T120, T120-K121, T135-S136, S136-G137, G138-T139, A162-L163, T164-S165, S165-G166, G194-T195, T195-Q196, y E388-N389 (dominio CH3) correspondiente a las SEQ ID números 126, 127, 129, 130, 131, 132, 149, 151, 152, 157, 158, 160, 166, 168, 169, 178, 179, 250, 251, 256, 257, 259, 265, 267, 268, 277, 278, 356, 358, 359, 364, 365, 367, 371, 373, 374, 380 y 381.

Tabla 25. Datos de farmacocinética.

SEQ anticuerpo	ID	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	AUC ^b hlgG (nM*hr)	AUC ^c MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF)/AUC(hlgG)
SEQ NO:151	ID	anti-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	SEQ ID NO: 1137	22485	21693	1.0
SEQ NO:152	ID	anti-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	SEQ ID NO: 1138	13880	12542	0.9
SEQ NO:157	ID	anti-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	SEQ ID NO: 1139	21494	16931	0.8
SEQ NO:158	ID	anti-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	SEQ ID NO: 1140	22833	23533	1.0
SEQ NO:166	ID	anti-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	SEQ ID NO: 1147	11178	10981	1.0
SEQ NO:168	ID	anti-hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	SEQ ID NO: 1148	20916	22125	1.1
SEQ NO:169	ID	anti-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	SEQ ID NO: 1149	23242	21304	0.9
SEQ NO:173	ID	anti-hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S190	SEQ ID NO: 1152	8922	8840	1.0
SEQ NO:178	ID	anti-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T195	SEQ ID NO: 1156	20702	18593	0.9
SEQ NO:179	ID	anti-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	SEQ ID NO: 1157	16083	17465	1.1
SEQ NO:202	ID	anti-hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	SEQ ID NO: 1172	1757	1550	0.9
SEQ NO:218	ID	anti-hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P331	SEQ ID NO: 1181	1362	1768	1.3
SEQ NO:220	ID	anti-hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G341	SEQ ID NO: 1182	17396	16060	0.9

ES 2 703 540 T3

SEQ anticuerpo	ID	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	AUC ^b hlgG (nM*hr)	AUC ^c MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hlgG)
SEQ NO:221	ID	anti-hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q342	SEQ ID NO: 1183	9214	10336	1.1
SEQ NO:224	ID	anti-hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E345	SEQ ID NO: 1186	15196	16061	1.1
SEQ NO:229	ID	anti-hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	SEQ ID NO: 1187	7867	8209	1.0
SEQ NO:127	ID	anti-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	SEQ ID NO: 1118	14224	14887	1.0
SEQ NO:239	ID	anti-hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	SEQ ID NO: 1195	8561	6136	0.7
SEQ NO:244	ID	anti-hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	SEQ ID NO: 1197	2378	2249	0.9
SEQ NO:248	ID	anti-hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	SEQ ID NO: 1199	28334	24130	0.9
SEQ NO:250	ID	anti-hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	SEQ ID NO: 1201	22854	24551	1.1
SEQ NO:251	ID	anti-hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	SEQ ID NO: 1202	21689	19734	0.9
SEQ NO:257	ID	anti-hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	SEQ ID NO: 1203	27232	24064	0.9
SEQ NO:259	ID	anti-hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	SEQ ID NO: 1204	17184	15404	0.9
SEQ NO:268	ID	anti-hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	SEQ ID NO: 1209	12794	13854	1.1
SEQ NO:277	ID	anti-hHER2-HC-G194-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	SEQ ID NO: 1215	20659	21603	1.0
SEQ NO:315	ID	anti-hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	SEQ ID NO: 1243	7590	8039	1.1
SEQ NO:317	ID	anti-hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	SEQ ID NO: 1245	12960	14302	1.1
SEQ NO:129	ID	anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	SEQ ID NO: 1122	21023	21257	1.0
SEQ NO:349	ID	anti-hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	SEQ ID NO: 1270	20329	16452	0.8

ES 2 703 540 T3

SEQ anticuerpo	ID	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	AUC ^b hlgG (nM*hr)	AUC ^c MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hlgG)
SEQ NO:32	ID	anti-hHER2-LC-V110-GDS-ppan- MC-MMAF-LSWLLRLLN-A111	SEQ ID NO: 1272	17358	18734	1.1
SEQ NO:33	ID	anti-hHER2-LC-A111-GDS-ppan- MC-MMAF-LSWLLRLLN-A112	SEQ ID NO: 1273	21011	20711	1.0
SEQ NO:46	ID	anti-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan- MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	SEQ ID NO: 1284	15444	17657	1.1
SEQ NO:48	ID	anti-hHER2-LC-S162-GDS-ppan- MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	SEQ ID NO: 1251	11348	11645	1.0
SEQ NO:56	ID	anti-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan- MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	SEQ ID NO: 1292	16832	17973	1.1
SEQ NO:63	ID	anti-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC- MMAF-LEFIASKLA-A111	SEQ ID NO: 1294	20373	24757	1.2
SEQ NO:64	ID	anti-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC- MMAF-LEFIASKLA-A112	SEQ ID NO: 1295	16092	16196	1.0
SEQ NO:75	ID	anti-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC- MMAF-LEFIASKLA-L154	SEQ ID NO: 1305	18406	19496	1.1
SEQ NO:89	ID	anti-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC- MMAF-LEFIASKLA-S202	SEQ ID NO: 1316	17223	15036	0.9
SEQ NO:330	ID	anti-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC- MMAF-LEFIASKLA-N390	SEQ ID NO: 1256	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ NO:195	ID	anti-hHER2-HC-R255-GDS-ppan- MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	SEQ ID NO: 1167	5657	6480	1.1
SEQ NO:206	ID	anti-hHER2-HC-P291-GDS-ppan- MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	SEQ ID NO: 1173	23692	29456	1.2
SEQ NO:288	ID	anti-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC- MMAF-LEFIASKLA-G236	SEQ ID NO: 1221	24430	27937	1.1
SEQ NO:249	ID	anti-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC- MMAF-LEFIASKLA-S119	SEQ ID NO: 1200	22713	19408	0.9
SEQ NO:323	ID	anti-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC- MMAF-LEFIASKLA-E345	SEQ ID NO: 1251	16731	19050	1.1
SEQ NO:322	ID	anti-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC- MMAF-LEFIASKLA-R344	SEQ ID NO: 1250	18942	22948	1.2
SEQ NO:301	ID	anti-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC- MMAF-LEFIASKLA-E272	SEQ ID NO: 1233	6651	7233	1.1

ES 2 703 540 T3

SEQ anticuerpo	ID	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	AUC ^b hlgG (nM*hr)	AUC ^c MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hlgG)
SEQ NO:279	ID	anti-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T197	SEQ ID NO: 1217	20702	24082	1.2
SEQ NO:293	ID	anti-hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	SEQ ID NO: 1226	2447	2783	1.1
SEQ NO:194	ID	anti-hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	SEQ ID NO: 1166	1609	1872	1.2
SEQ NO:337	ID	anti-hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	SEQ ID NO: 1261	20158	21424	1.1
SEQ NO:201	ID	anti-hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	SEQ ID NO: 1171	2566	2414	0.9
SEQ NO:265	ID	anti-hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	SEQ ID NO: 1207	26501	27992	1.1
SEQ NO:274	ID	anti-hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	SEQ ID NO: 1213	21971	25264	1.1
SEQ NO:275	ID	anti-hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	SEQ ID NO: 1214	25220	27786	1.1
SEQ NO:177	ID	anti-hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G194	SEQ ID NO: 1155	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ NO:294	ID	anti-hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	SEQ ID NO: 1227	2435	2514	1.0
SEQ NO:199	ID	anti-hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	SEQ ID NO: 1169	1916	1927	1.0
SEQ NO:198	ID	anti-hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	SEQ ID NO: 1168	2481	2631	1.1
SEQ NO:189	ID	anti-hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	SEQ ID NO: 1163	15932	15515	1.0
SEQ NO:223	ID	anti-hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R344	SEQ ID NO: 1185	16217	17009	1.0
SEQ NO:193	ID	anti-hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	SEQ ID NO: 1165	3203	2996	0.9
SEQ NO:182	ID	anti-hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	SEQ ID NO: 1160	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ NO:296	ID	anti-hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E258	SEQ ID NO: 1228	3036	2834	0.9

ES 2 703 540 T3

SEQ anticuerpo	ID	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	AUC ^b hlgG (nM*hr)	AUC ^c MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hlgG)
SEQ NO:278	ID	anti-hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	SEQ ID NO: 1216	23422	25475	1.1
SEQ NO:150	ID	anti-hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	SEQ ID NO: 1136	14235	12465	0.9
SEQ NO:185	ID	anti-hHER2-HC-A231-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	SEQ ID NO: 1161	18890	18982	1.0
SEQ NO:47	ID	anti-hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	SEQ ID NO: 1285	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ NO:91	ID	anti-hHER2-LC-S203-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P204	SEQ ID NO: 1317	18663	19769	1.1
SEQ NO:60	ID	anti-hHER2-LC-S203-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P204	SEQ ID NO: 1318	26363	31434	1.2
SEQ NO:61	ID	anti-hHER2-LC-K207-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S208	SEQ ID NO: 1319	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ NO:90	ID	anti-hHER2-LC-S202-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S203	SEQ ID NO: 1320	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ NO:44	ID	anti-hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	SEQ ID NO: 1282	22890	25331	1.1
SEQ NO:267	ID	anti-hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	SEQ ID NO: 1208	23675	24973	1.1
SEQ NO:176	ID	anti-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	SEQ ID NO: 1154	21492	20712	1.0
SEQ NO:180	ID	anti-hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	SEQ ID NO: 1158	19695	19974	1.0
SEQ NO:175	ID	anti-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	SEQ ID NO: 1153	18430	16233	0.9
SEQ NO:341	ID	anti-hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N421	SEQ ID NO: 1265	32553	34202	1.1
SEQ NO:289	ID	anti-hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G237	SEQ ID NO: 1222	14771	16398	1.1
SEQ NO:342	ID	anti-hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	SEQ ID NO: 1266	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ NO:45	ID	anti-hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q155	SEQ ID NO: 1283	n.d.	n.d.	n.d.

ES 2 703 540 T3

SEQ anticuerpo	ID	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	AUC ^b hlgG (nM*hr)	AUC ^c MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hlgG)
SEQ NO:237	ID	anti-hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	SEQ ID NO: 1193	15181	18255	1.2
SEQ NO:187	ID	anti-hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	SEQ ID NO: 1162	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ NO:160	ID	anti-hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T139	SEQ ID NO: 1141	21276	24046	1.1
SEQ NO:372	ID	anti-hHER2-HC-L163-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T164	SEQ ID NO: 1322	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ NO:374	ID	anti-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-G166	SEQ ID NO: 1323	21008	23328	1.1
SEQ NO:376	ID	anti-hHER2-HC-S190-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S191	SEQ ID NO: 1324	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ NO:377	ID	anti-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S192	SEQ ID NO: 1325	27588	28786	1.0
SEQ NO:378	ID	anti-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-L193	SEQ ID NO: 1326	27124	24221	0.9
SEQ NO:380	ID	anti-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T195	SEQ ID NO: 1327	23858	27185	1.1
SEQ NO:383	ID	anti-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-V110	SEQ ID NO: 1329	21940	19449	0.9
SEQ NO:299	ID	anti-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	SEQ ID NO: 1231	12525	14829	1.2
SEQ NO:300	ID	anti-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	SEQ ID NO: 1232	12981	14803	1.1
SEQ NO:77	ID	anti-hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	SEQ ID NO: 1307	30628	33193	1.1
SEQ NO:370	ID	anti-hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A162	SEQ ID NO: 1321	23116	25913	1.1
SEQ NO:381	ID	anti-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-Q196	SEQ ID NO: 1328	25023	26308	1.1
SEQ NO:384	ID	anti-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A111	SEQ ID NO: 1330	27475	31910	1.2

SEQ ID anticuerpo	Nombre ^a ADC	ADC SEQ ID NO	AUC ^b hlgG (nM*hr)	AUC ^c MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hlgG)
^a Nombre representa parte de la HC o LC que contiene la etiqueta peptídica con el compuesto unido, no estando en la lista la cadena tipo silvestre pareada. ^b Área bajo la curva medida por IgG ELISA anti-humana. n.d., no determinado.					

Ejemplo 27. Marcación de IgG marcadas con péptidos con una 4'-fosfopanteteiniltransferasa coexpresada en medio de cultivo celular

Para agilizar el proceso de preparación de ADCs, se llevó a cabo la marcación enzimática de los anticuerpos marcados con péptidos con 4'-fosfopanteteiniltransferasa coexpresada (PPTasa) en medios de expresión Freestyle™ (Invitrogen). Además de reducir el número de etapas de purificación, la coexpresión de la PPTasa durante la producción de anticuerpos podría evitar los problemas asociados con la adición y la eliminación de una versión producida de forma recombinante de dicha enzima. Como prueba de concepto, se usó AcpS PPTasa de E. coli para conjugar específicamente un anticuerpo marcado con A1 con acetil coenzima A (acetil CoA) en medio de cultivo celular.

Para facilitar la coexpresión, el gen que codifica la AcpS PPTasa se clonó en el vector de expresión pRS de mamífero, que anexa la secuencia de señal N-terminal MKTFILLWVLLWVIFLLPGATA (SEQ ID NO: 355). La construcción, pRS-AcpS, también agrega una etiqueta His₆ C-terminal a la enzima recombinante (SEQ ID NO: 1106). Para coexpresar el anticuerpo mAb2-HC-E388-GDSLDMLEWSLM-N389 marcado con A1 (SEQ ID NO: 356), se insertó un fragmento de oligonucleótido que codifica la secuencia del péptido A1 de 12 aminoácidos en el gen de la cadena pesada del anticuerpo Mab2-HC (SEQ ID NO: 147) en el vector de expresión de mamíferos pM4, dando como resultado el constructo pM4-A1. Este plásmido también coexpresa la correspondiente cadena ligera bajo el promotor CMV. Usando el método PEI (Meissner et al., 2001), se transfectaron transitoriamente 293 células Freestyle™ con una mezcla 1:1 de los plásmidos de expresión recombinante pM4-A1 y pRS-AcpS, y se cultivaron en cinco alícuotas de 200 mL de medios de expresión Freestyle™ (Invitrogen) durante cinco días a 37°C bajo 5% de CO₂. A continuación, los cultivos celulares se recogieron por centrifugación a 2.000 rpm durante 10 minutos, se pasaron a través de filtros de 0.22 µm y se agruparon. Para determinar las concentraciones mínimas de anticuerpos y enzimas requeridas para la formación eficiente del conjugado en el medio de cultivo celular, se dejaron sin concentrar las porciones de filtrado o concentradas 2 veces, 5 veces, 10 veces y 20 veces usando un corte de 30 kDa unidades de filtración centrífuga Amicon Ultra (EMD Millipore). Las muestras concentradas se centrifugaron a 3.724 x g durante 2 minutos para eliminar el precipitado. Con el fin de optimizar las condiciones del medio de cultivo celular para la catálisis AcpS, todas las muestras se complementaron con un regulador de reacción 10 veces mayor (pH 8.8) hasta una concentración final de 75 mM de Tris-HCl y 10 mM de MgCl₂. Las reacciones de marcación se iniciaron luego mediante la adición de un sustrato de acetil CoA (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 mM. Las mezclas de reacción resultantes con volúmenes de 1.5 mL a 15 mL se incubaron durante aproximadamente 16 horas a 37°C.

Para determinar el grado de marcación del anticuerpo marcado con A1, así como para cuantificar los niveles de expresión tanto de la enzima como del anticuerpo, todas las mezclas de reacción se purificaron mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA y Proteína A, respectivamente. Con la excepción de la muestra no concentrada, todas las mezclas de reacción se diluyeron dos veces con PBS antes de cargarlas en columnas de Proteína A-Sepharose equilibrada con PBS (0.5 mL de volumen de lecho, GE Healthcare) a una rata de flujo aproximado de 1 mL/min. El flujo de la columna se aplicó directamente a las columnas IMAC equilibradas con PBS llenas con 0.5 mL de Ni-NTA Agarosa (Qiagen). Todas las columnas de afinidad de proteína A y Ni-NTA se lavaron con 40 volúmenes de columna de regulador Tris-HCl 50 mM (pH 8) suplementado con NaCl 300 mM y imidazol 20 mM. La enzima AcpS marcada con His₆ (SEQ ID NO: 1106) se eluyó de las columnas de afinidad Ni-NTA con 6 volúmenes de columna de regulador Tris-HCl 50 mM (pH 8) que contenía NaCl 300 mM y imidazol 250 mM. Del mismo modo, el anticuerpo marcado A1 se eluyó de las columnas de afinidad de la Proteína A con 6 volúmenes de columna de regulador de acetato de sodio 0.1 M (pH 3.0), seguido de neutralización inmediata con 12% (v/v) de regulador Tris-HCl 1 M (pH 10).

La SDS-PAGE y la ESI-MS confirmaron la elución de la enzima AcpS y el anticuerpo marcado con A1, respectivamente. Las mediciones de UV-Vis y Bradford indicaron que se recuperaron entre 0.17 mg y 0.34 mg de anticuerpo marcado con A1 y entre 0.12 mg y 0.15 mg de enzima AcpS (Tabla 26). Esto sugiere una concentración de anticuerpo que varía de 0.08 µM (13 mg/L) en medio de cultivo celular no concentrado a 1.5 µM (230 mg/L) en medio de cultivo celular concentrado 20 veces durante las reacciones de marcación con acetil CoA. Por lo tanto, la concentración del anticuerpo marcado con A1 es aproximadamente proporcional al factor de concentración del medio de cultivo celular. De manera similar, la concentración de la PPTasa AcpS aumenta de 0.6 µM (9 mg/L) en medio de cultivo celular no concentrado a 6.8 µM (100 mg/L) en medio de cultivo celular concentrado 20 veces.

Tabla 26. Rendimientos de expresión de mAb2-HC-E388-GDSLDMLEWSLM-N389 (SEQ ID NO: 356) y AcpS PPTasa, así como la evaluación espectrométrica de masas de la marcación enzimática en medio de cultivo celular.

Factor de concentración de medio de cultivo	Rendimiento de AcpS PPTasa (mg) ^a	Concentración de AcpS durante marcación en medio (μM)	Rendimiento de mAb2-HC-E388-GDSLDMLEW SLM-N389 (SEQ ID NO: 356) (mg) ^b	Concentración de AbDurante marcación en medio (μM)	Masa observada (Da)	Masa esperada (Da) ^c
1 x	0.14	0.6	0.19	0.08	51927.89 51587.6	No acoplado, 51589.2 Acoplado, 51971.6 Acoplado y desacetilado, 51929.6
2 x	0.12	1.1	0.17	0.16	51927.56	
5 x	0.14	1.9	0.31	0.41	51927.94	
10 x	0.14	3.8	0.32	0.85	51927.94	
20 x	0.15	6.8	0.34	1.5	51928.1	
^a Rendimiento a partir de 13 mL (factor de concentración 1x), 12 mL (factor de concentración 2x), 22 mL (factor de concentración 5-10x), y 26 mL (factor de concentración 20x) de cultivo de acuerdo con el análisis de Bradford (promedio de dos mediciones).						
^b Rendimiento de acuerdo con mediciones UV-Vis en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (promedio de dos mediciones).						
^c Se muestran las masas esperadas para la formación de ácido piroglutámico del residuo glutamina N-terminal de la cadena pesada después de la escisión del péptido de señalización.						

Los constructos de anticuerpos purificados se concentraron utilizando unidades de filtro centrífugas Amicon Ultra de 30 kDa, se redujeron y desglucosilaron seguidas de un análisis espectrométrico de masas en un instrumento Agilent 6520 Q-TOF (Agilent Technologies). Como se muestra en la Tabla 26, un factor de concentración doble del medio de cultivo celular condicionado es suficiente para una conjugación casi cuantitativa en presencia de 1 mM de sustrato de acetil CoA, 0.16 μM (24 mg/L) de anticuerpo marcado A1, y 1.1 μM (17 mg/L) de enzima AcpS. En particular, el grupo acetilo del sustrato de acetil CoA se separa completamente durante la marcación en el medio, lo que indica la hidrólisis del enlace tioéster en medio de cultivo celular acondicionado. En un experimento independiente con medio de cultivo celular concentrado 30 veces, se encontró que, en ausencia de acetil CoA añadida exógenamente, no se detectó formación de conjugado por espectrometría de masas. Por lo tanto, este control negativo excluye la presencia de cantidades significativas de CoA o uno de sus análogos en el medio de cultivo celular.

En resumen, el experimento demuestra que un anticuerpo marcado con péptido se puede marcar cuantitativamente con un análogo de CoA suplementado en medio de cultivo celular concentrado 2 veces mediante catálisis con PPTasa. Debido a que las concentraciones de anticuerpos durante la fermentación de las líneas celulares de producción son significativamente más altas que en los experimentos actuales de prueba de concepto, se puede anticipar que la conjugación enzimática de análogos de CoA suplementados a un anticuerpo marcado con péptido será escalable a los niveles de producción. Los análogos de CoA suplementados presentarán un grupo tiol, un grupo tiol protegido o un grupo reactivo bioortogonal tal como un aldehído, un grupo ceto, un azido o un grupo alquino. Tras la purificación de la Proteína A, el anticuerpo activado enzimáticamente con un grupo reactivo podría hacerse reaccionar con un análogo de toxina complementario para proporcionar el ADC correspondiente en la segunda etapa.

Ejemplo 28. Modificación específica del sitio de un anticuerpo marcado con péptido con cetona CoA en medio de cultivo celular

El objetivo de este experimento es demostrar la viabilidad de unir específicamente un grupo bioortogonal a un anticuerpo marcado con péptido en un medio de cultivo celular acondicionado. El primer paso del método de dos etapas se llevó a cabo con el análogo de cetona CoA cuya síntesis se ha descrito en el Ejemplo 23. La marcación exitosa en el medio de un anticuerpo marcado con péptido con este análogo de CoA funcionalizado con carbonilo permitirá la posterior unión de una carga útil funcionalizada con aminooxi a través de la ligación de oxima en el segundo paso del método de dos etapas (véase también la Fig. 22).

Usando el método PEI (Meissner et 2001), se transfectaron transitoriamente 293 células Freestyle™ con una mezcla 1:1 de los plásmidos de expresión recombinante pM4-A1 y pRS-AcpS, que se han descrito en el Ejemplo 27. Después de cultivar se cotransfectaron células de mamífero en 400 mL de medio de expresión Freestyle™ (Invitrogen) durante cinco días a 37°C bajo 5% de CO₂, el cultivo celular se recogió mediante centrifugación a 2.000 rpm durante 10 minutos y se pasó a través de filtros de 0.22 µm. A continuación, una parte alícuota de 60 mL de medio de cultivo celular despejado se concentró 20 veces utilizando unidades de filtro centrífugo Amicon Ultra de 30 kDa (EMD Millipore). Después de eliminar el precipitado por centrifugación a 3.724 x g durante 5 minutos, la reacción de marcación se inició complementando 1.31 mL de concentrado con cetona CoA a una concentración final de 1 mM y 10 veces de regulador de reacción (pH 8.8) a una concentración final de 75 mM de Tris-HCl y 10 mM de MgCl₂. La reacción enzimática en un volumen total de 1.5 mL se incubó durante aproximadamente 16 horas a 37°C.

Antes de analizar el grado de marcación con análogo de CoA funcionalizado con carbonilo por espectrometría de masas, la mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía de afinidad con proteína A. Después de una dilución doble con PBS, la mezcla de reacción diluida se cargó en una columna de Proteína A-Sepharose equilibrada con PBS (0.6 mL de volumen de lecho, GE Healthcare) a una tasa de flujo aproximado de 1 mL/min. La matriz de la columna se lavó con aproximadamente 40 volúmenes de lecho de PBS antes de que el material retenido se eluyera con 6 volúmenes de columna de regulador de acetato de sodio 0.1 M (pH 3). Finalmente, el eluido se neutralizó mediante la adición de 12% (v/v) de 1 M de regulador Tris-HCl (pH 10).

La pureza del anticuerpo se evaluó por SDS-PAGE de reducción. De acuerdo con las mediciones de UV-Vis en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, se recuperaron 0.34 mg de anticuerpo, que corresponde a una concentración de anticuerpo de 1.5 µM (230 mg/L) en el medio de cultivo celular concentrado 20 veces. Esto reproduce exactamente la concentración de anticuerpo medida durante la reacción de marcación con acetil CoA en medio de cultivo celular concentrado 20 veces (Ejemplo 27). Para evaluar el grado de marcación del anticuerpo con cetona CoA por espectrometría de masas, el eluido neutralizado se concentró utilizando unidades de filtro centrífugas Amicon Ultra de 30 kDa, desglucosiladas y reducidas. El análisis espectrométrico de masas en un instrumento Agilent 6520 Q-TOF indicó la formación del conjugado de anticuerpo carbonil funcionalizado deseado (observado, 51995.32; esperado, 51999.6), con una formación de aproximadamente 24% del anticuerpo modificado con 4'-fosfopanteteína como un producto secundario (observado, 51925.42; esperado, 51929.6). No se detectó ningún anticuerpo no conjugado en el espectro de masas en desconvolución (esperado, 51589.2). La presencia de anticuerpo modificado con 4'-fosfopanteteína como un producto secundario podría explicarse por la formación incompleta de CoA de cetona durante la reacción entre CoA-SH y metil vinil cetona (Ejemplo 23).

Los resultados experimentales indican la viabilidad de la conjugación específica del sitio de grupos carbonilo con anticuerpos en medio de cultivo celular acondicionado. Esta metodología puede extenderse a otros grupos bioortogonales, como las unidades estructurales azido y alquino. Dichos grupos bioortogonales son completamente inertes en el medio de cultivo celular y reaccionan exclusivamente con la carga útil que contiene el grupo funcional complementario, lo que garantiza la formación de ADC homogéneos en la segunda etapa del método de dos etapas.

Ejemplo 29. Evaluación de la eficacia *in vivo* de un ADC MMAF de trastuzumab marcado con ybbR

La eficacia *in vivo* del anti-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389 marcación con ybbR ADC se evaluó mediante el uso de un modelo de tumor de xenoinjerto, que se basa en la implantación de una línea de células tumorales humanas en ratones desnudos inmunodeficientes. Como se describió anteriormente (Sausville and Burger, 2006), los estudios con dichos ratones con xenoinjerto de tumores han proporcionado información valiosa sobre la eficacia *in vivo* de los reactivos contra el cáncer. Específicamente, el estudio de eficacia *in vivo* se llevó a cabo con ratones nu/nu que se inyectaron por vía subcutánea con células del clon 16 MDA-MB231 (Morton and Houghton, 2007). Esta línea celular se eligió en función de los ensayos de potencia *in vitro* previos que revelaron su alta sensibilidad al ADC MMAF marcación con ybbR mencionado anteriormente de una manera dependiente del antígeno (consulte la Tabla 24). Una vez que el tumor alcanzó un tamaño de aproximadamente 200 mm³, se inyectó por vía intravenosa el ADC MMAF marcado con ybbR en una dosis única de 5 mg/kg o 3 mg/kg, y cada grupo de tratamiento comprendía nueve ratones. Después de administrar el conjugado anticuerpo-fármaco, el crecimiento del tumor se controló semanalmente. Como se muestra en la Figura 23, la administración i.v. del ADC MMAF marcado con ybbR causó la regresión del tumor en ambos niveles de dosis. Además, el tratamiento de los ratones con ADC fue bien tolerado y no se observó pérdida de peso en ninguno de los grupos de tratamiento. La regresión efectiva de los tumores del clon 16 de MDA-MB231 en dosis únicas tan bajas como 3 mg/kg demuestra que el ADC marcado con ybbR es eficaz en un modelo de ratón dependiente de HER2. Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication; National Academy Press, 8th edition, 2001).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo modificado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos una etiqueta peptídica que es un sustrato de 4'-fosfopanteteinil transferasa, y está localizado dentro de un bucle estructural de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma, en donde dicha 4'-fosfopanteteiniltransferasa es Sfp, AcpS, PPTasa de *T. maritima*, PPTasa humana o una forma mutante u homóloga de la misma que retiene la actividad de la 4'-fosfopanteteinil-transferasa; y en donde la etiqueta peptídica se selecciona del grupo que consiste en:
- 5 GDSLSWLLRLLN (SEQ ID NO: 1),
 GDSLSWL (SEQ ID NO: 2),
 GDSLSWLVRCLN (SEQ ID NO: 3),
 10 GDSLSWLLRCLN (SEQ ID NO: 4),
 GDSLSWLVRLLN (SEQ ID NO: 5),
 GDSLSWLLRSLN (SEQ ID NO: 6),
 GSQDVLSLEFIASKLA (SEQ ID NO: 7),
 VLDSLEFIASKLA (SEQ ID NO: 8),
 15 DSLEFIASKLA (SEQ ID NO: 9),
 GDSLDMLEWSLM (SEQ ID NO: 10),
 GDSLDMLEWSL (SEQ ID NO: 11),
 GDSLDMLEWS (SEQ ID NO: 12),
 GDSLDMLEW (SEQ ID NO: 13),
 20 DSLDMLEW (SEQ ID NO: 14),
 GDSLDM (SEQ ID NO: 15),
 LDSVRMMALAAR (SEQ ID NO: 16),
 LDSLDMLEWSLR (SEQ ID NO: 17),
 DSLEFIASKL (SEQ ID NO: 18),
 25 DSLEFIASK (SEQ ID NO: 19),
 DVLSLEFI (SEQ ID NO: 20),
 VLDSLEFIAS (SEQ ID NO: 21), y
 DSLDMLEWSL (SEQ ID NO: 1132),
- 30 y en donde la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 110 y 111 de la cadena ligera, o la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 119 y 120, o entre los residuos de aminoácidos 120 y 121, o entre los residuos de aminoácidos 135 y 136, o entre los residuos de aminoácidos 136 y 137, o entre los residuos de aminoácidos 138 y 139, o entre los residuos de aminoácidos 162 y 163, o entre los residuos de aminoácidos 164 y 165, o entre los residuos de aminoácidos 165 y 166, o entre los aminoácidos residuos 194 y 195, o entre los residuos de aminoácidos 195 y 196 del dominio CH1; o la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos
- 35 de aminoácidos 388 y 389 del dominio CH3; en donde los aminoácidos están numerados de acuerdo con el sistema de numeración Eu.
2. Un anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde la etiqueta peptídica se selecciona del grupo que consiste en:
- 40 GDSLDMLEWSLM (SEQ ID NO: 10),
 GDSLDMLEWSL (SEQ ID NO: 11),
 GDSLDMLEWS (SEQ ID NO: 12),
 GDSLDMLEW (SEQ ID NO: 13),

DSLDMLEW (SEQ ID NO: 14), y

DSLDMLEWSL (SEQ ID NO: 1132),

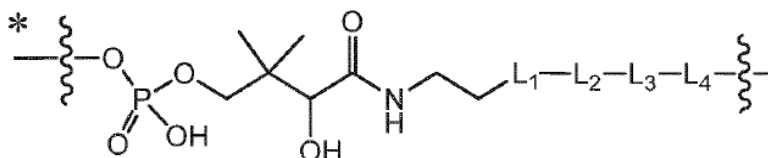
en donde la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 110 y 111 de la cadena ligera, o la etiqueta peptídica se inserta entre los residuos de aminoácidos 119 y 120, o entre los residuos de aminoácidos 120 y 121, o entre los residuos de aminoácidos 135 y 136, o entre los residuos de aminoácidos 136 y 137, o entre los residuos de aminoácidos 165 y 166 del dominio CH1, o entre los residuos de aminoácidos 388 y 389 del dominio CH3.

3. El anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho anticuerpo comprende, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:267, SEQ ID NO:268, SEQ ID NO:277, SEQ ID NO:278, SEQ ID NO:356, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:365, SEQ ID NO:367, SEQ ID NO:371, SEQ ID NO:373, SEQ ID NO:374, SEQ ID NO:380, SEQ ID NO:381 o SEQ ID NO:384.

4. El anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 3, en donde dicho anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 132, la SEQ ID NO: 356, la SEQ ID NO: 358, la SEQ ID NO: 359, la SEQ ID NO: 364, la SEQ ID NO: 365, o SEQ ID NO: 374.

5. El anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano o humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo; o el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un isotipo seleccionado de IgG, IgM, IgE e IgA; o en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un subtipo de IgG seleccionado de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; o en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo anti-HER2 o fragmento de unión a antígeno anti-HER2.

6. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo modificado o el fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y un grupo terminal; en donde dicho grupo terminal está unido al anticuerpo modificado o al fragmento de unión a antígeno del mismo mediante un enlazador que tiene la estructura de acuerdo con la Fórmula (1-b):



Fórmula 2 (1-b)

en donde:

L₁ es un enlace, un enlazador no enzimáticamente escindible, un enlazador no escindible; un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible;

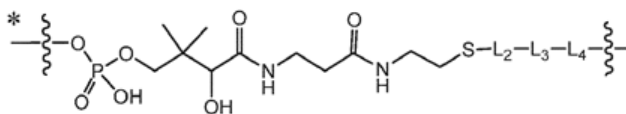
L₂ es un enlace, un enlazador no escindible no enzimáticamente, un enlazador no escindible; un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible;

L₃ es un enlace, un enlazador no escindible enzimáticamente, un enlazador no escindible; un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable o un enlazador fotoescindible;

L₄ es un enlace, un enlazador no enzimáticamente escindible, un enlazador no escindible; un enlazador escindible enzimáticamente, un enlazador fotoestable, un enlazador fotoescindible o un espaciador autoinmolante,

el * denota donde la unidad estructural 4'-fosfopanteteinilo está unida a la etiqueta del péptido, y en donde el grupo terminal es una unidad estructural de fármaco, una sonda de afinidad, un quelante, una sonda espectroscópica, una sonda radioactiva, un reactivo de imagen, una molécula lipídica, un polietilenglicol, un polímero, una nanopartícula, un punto cuántico, un liposoma, una partícula de PLGA, un polisacárido, un grupo acetilo o una superficie;

o el enlazador tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (1-c):



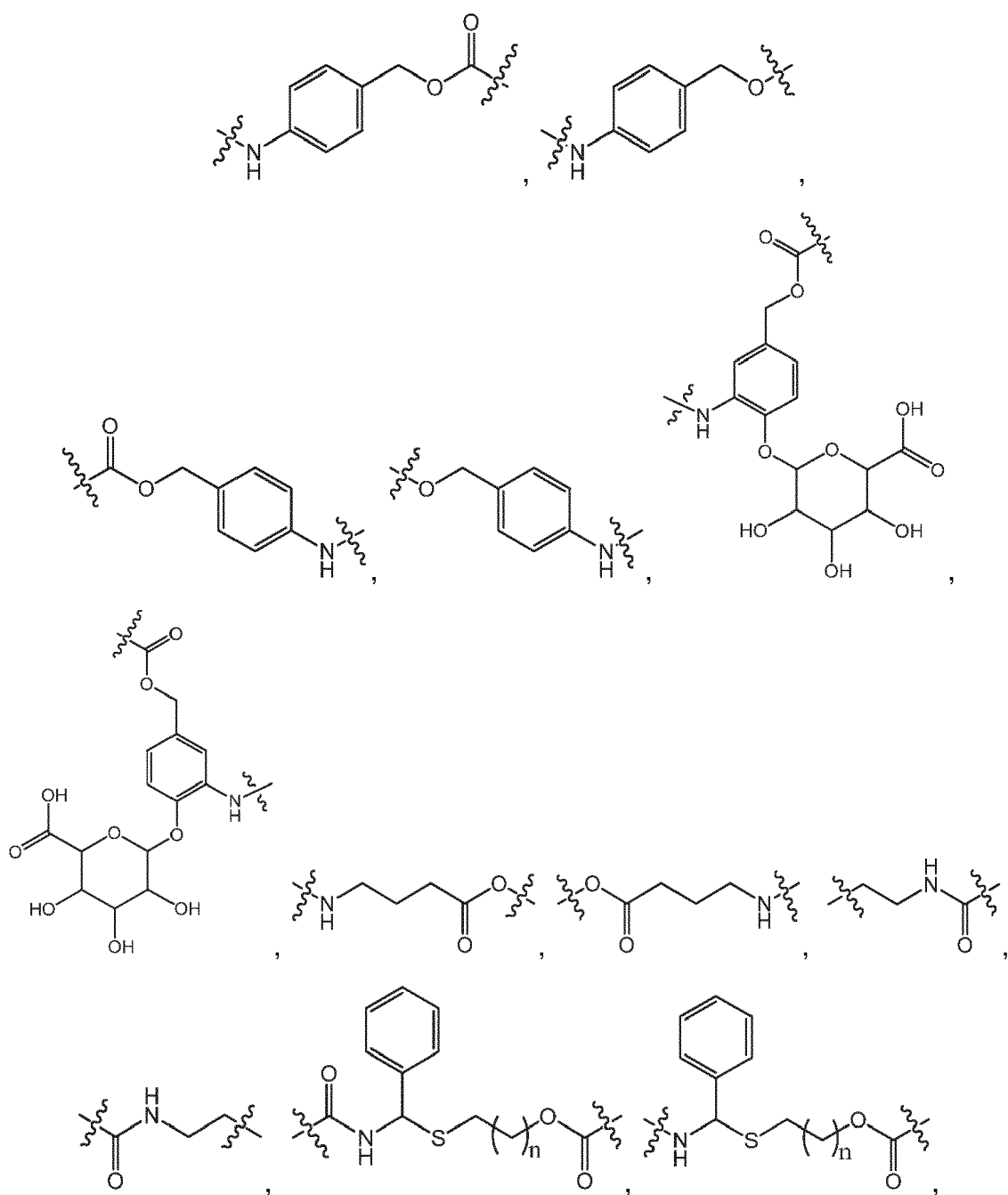
Fórmula (I-c)

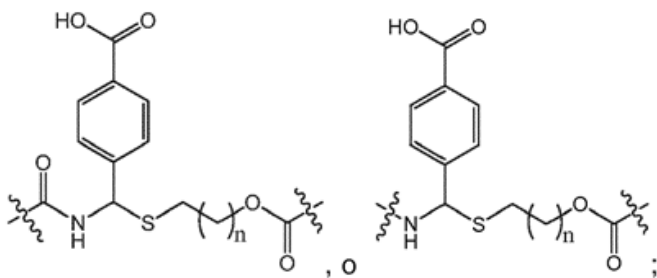
en donde:

L_2 es un enlace, $-A_2-$, o $-A_2X^2-$;

L_3 es un enlace, $-A_3-$, o $-A_3X^2-$;

L_4 es un enlace, $-A_4-$, $-A_4X^{2-}$,

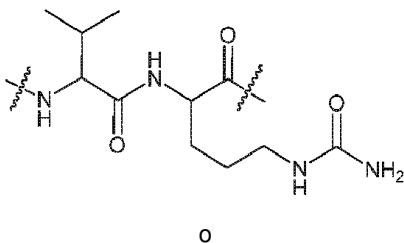




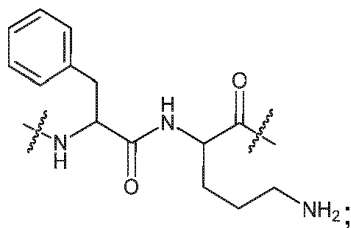
5

10

15

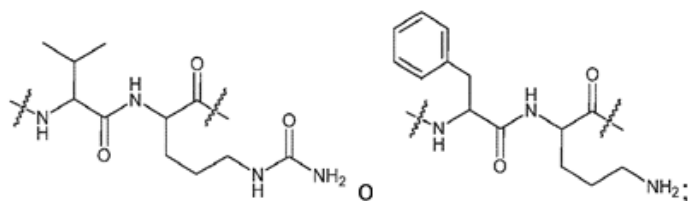


20



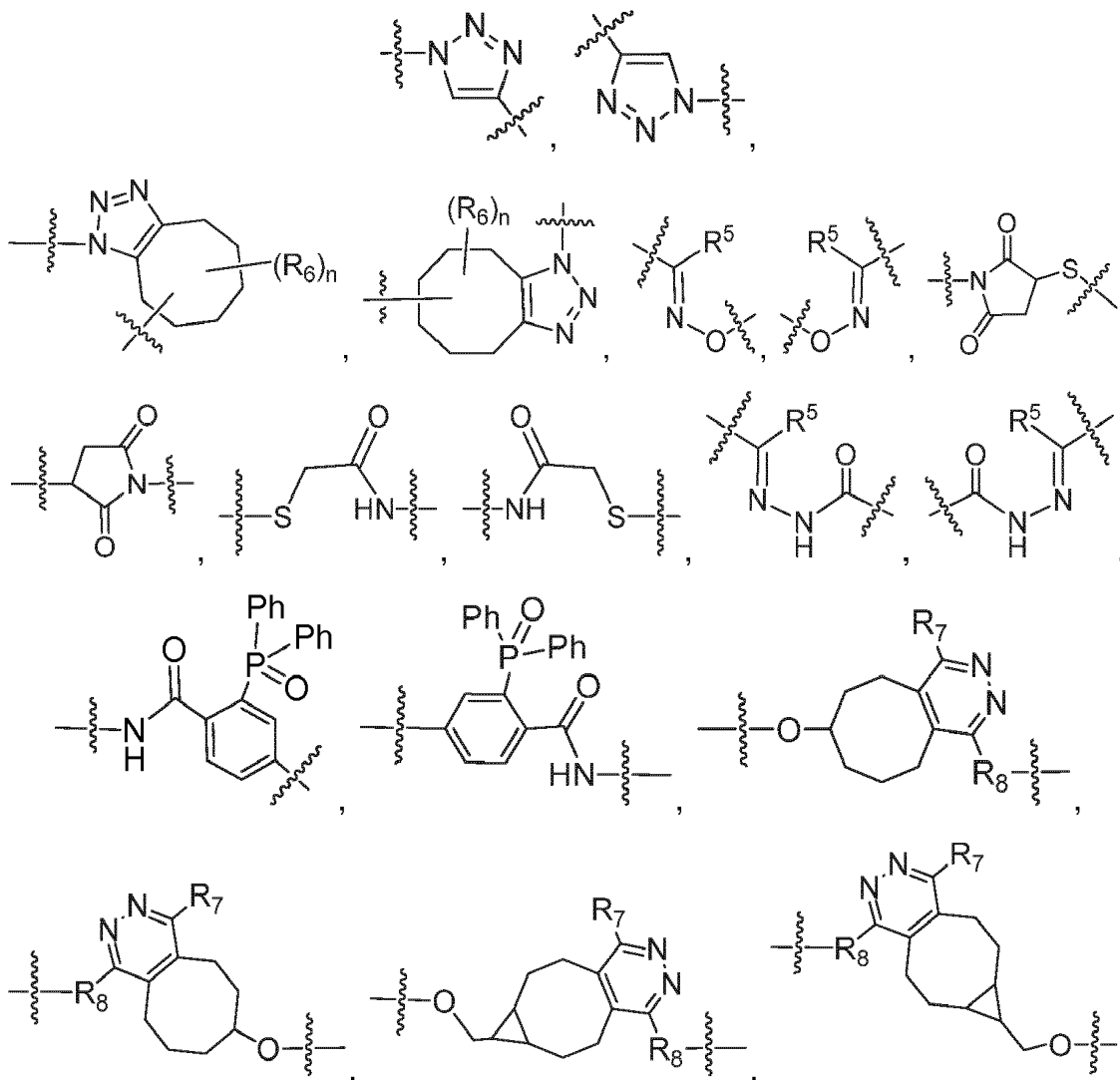
25

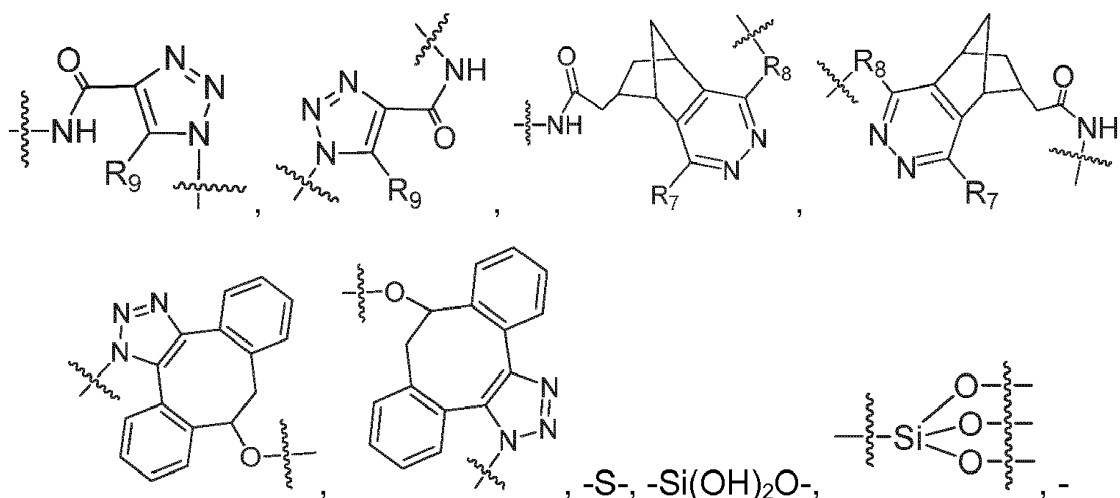
30



- 5 A₄ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -[O(CH₂)_n]_m-, -[O(C(R⁴)₂)_n]_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-,
 -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-,
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-,
 O-
 (O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-;

- 10 cada X² se selecciona independientemente de un enlace,





CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH- y -NHC(=O)-;

cada R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, -C(=O)OH y -OH,

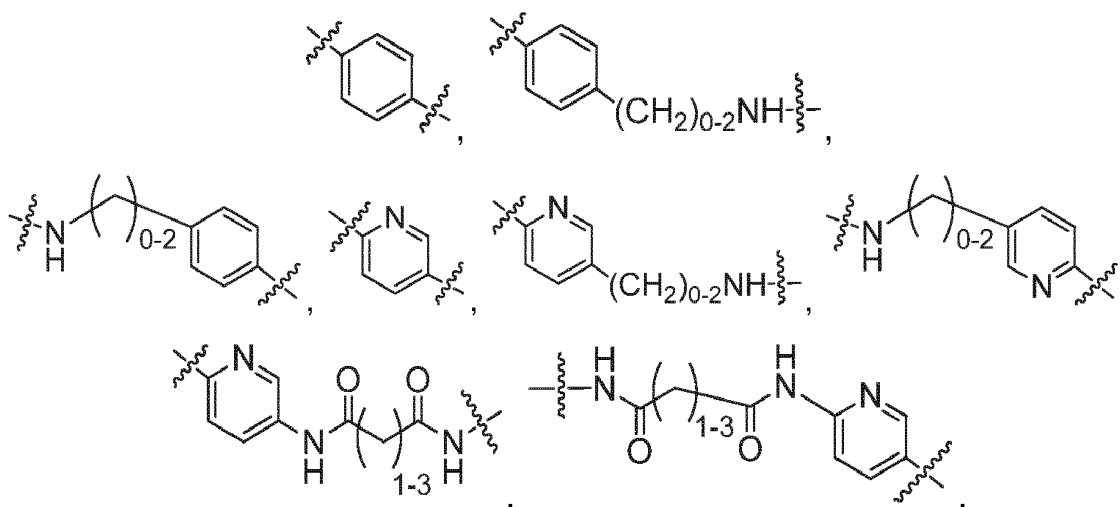
5 cada R⁵ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, fenilo o alquilo C₁₋₄ sustituido con 1 a 3 grupos OH;

cada R⁶ se selecciona independientemente de H, flúor, benciloxi sustituido con -C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

R⁷ se selecciona independientemente de H, fenilo y piridina;

R⁸ se selecciona independientemente de

10



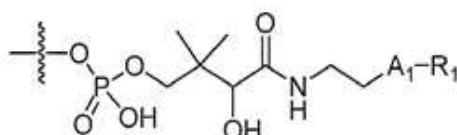
R⁹ se selecciona independientemente de H y haloalquilo C₁₋₆;

cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y

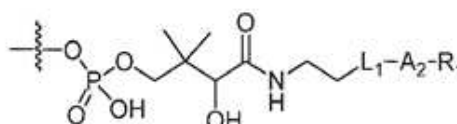
15 cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9,

en donde el grupo terminal es una unidad estructural seleccionada de un agente antiinflamatorio, un agente contra el cáncer, un agente antifúngico, un agente antibacteriano, un agente antiparasitario, un agente antiviral, un agente anestésico, un inhibidor de V-ATPasa, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTor, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, un maitansinoide, un MetAP (metionina aminopeptidasa), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, un inhibidor de las reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de la CDK2, un inhibidor de la CDK9, un inhibidor de la Eg5, un inhibidor de la HDAC, un agente dañino del ADN, un agente alquilante del ADN, un intercalador de ADN, un ligante de la ranura del ADN, un inhibidor de proteasoma, un inhibidor de ARN polimerasa y un inhibidor de DHFR; o en donde el grupo terminal se selecciona entre un fluoróforo, un cromóforo, un punto cuántico, una sonda magnética, una sonda radioactiva, un reactivo de formación de imágenes, un reactivo de contraste o una sonda de afinidad.

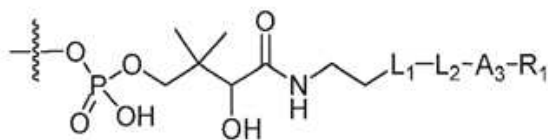
7. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del inmunoconjugado de la reivindicación 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. El anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o el inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 6 para uso como un medicamento.
- 5 9. El anticuerpo modificado o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el inmunoconjugado según la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de cáncer, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad infecciosa.
10. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo modificado o el fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 10 11. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.
12. Un método para producir el inmunoconjugado de la reivindicación 6 que comprende
- (a) incubar en condiciones adecuadas el anticuerpo modificado o el fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, una 4'-fosfopanteteinil transferasa, y un grupo terminal unido a CoA o un grupo terminal unido a un análogo de CoA, promoviendo así formación del inmunoconjugado que comprende el anticuerpo
- 15 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el grupo terminal unido entre sí por un enlazador que comprende una 4'-fosfopanteteína o un análogo de 4'-fosfopanteteína;
- b)
- i) incubar en condiciones adecuadas un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 con una 4'-fosfopanteteinil transferasa y CoA o un análogo de CoA, uniendo así una 4'-
- 20 fosfopanteteína o un análogo de 4'-fosfopanteteína al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la 4'-fosfopanteteína y el análogo de 4'-fosfopanteteína comprenden un grupo funcional, y
- ii) hacer reaccionar la 4'-fosfopanteteína o el análogo de 4'-fosfopanteteína con un grupo reactivo opcionalmente unido a un grupo terminal, formando así el inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y el grupo terminal unido entre sí por un enlazador que comprende una 4'-fosfopanteteína o un análogo de
- 25 4'-fosfopanteteína; o
- c)
- i) incubar en condiciones adecuadas un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 con una 4'-fosfopanteteinil transferasa y CoA o un análogo de CoA, uniendo así una 4'-
- 30 fosfopanteteína o un análogo de 4'-fosfopanteteína al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la 4'-fosfopanteteína y el análogo de 4'-fosfopanteteína comprenden un grupo funcional protegido;
- ii) desproteger el grupo funcional protegido de la 4'-fosfopanteteína o el análogo de la 4'-fosfopanteteína, y
- iii) hacer reaccionar el grupo funcional desprotegido de la 4'-fosfopanteteína o el análogo de 4'-fosfopanteteína con un grupo reactivo opcionalmente unido a un grupo terminal, formando así el inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y el grupo terminal unido entre sí por un enlazador que
- 35 comprende una 4'-fosfopanteteína o un análogo de 4'-fosfopanteteína; en donde dichas condiciones adecuadas comprenden una temperatura entre 4°C a 37°C y pH 6.5 a pH 9.0.
13. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo modificado o el fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde un residuo de serina de la etiqueta peptídica en dicho anticuerpo modificado o el fragmento de unión a antígeno del mismo se conjuga con un grupo 4'-fosfopanteteína que tiene la estructura de Fórmula (D-a), Fórmula (E-a), Fórmula (F-a) o Fórmula (G-a):
- 40



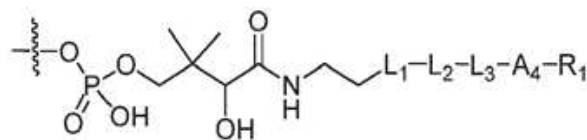
Fórmula (D-a)



Fórmula (E-a)



Fórmula (F-a)



Fórmula (G-a)

en donde:

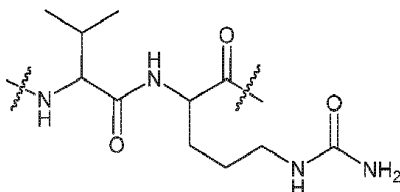
L₁ es -A₁X²⁻ o -X²⁻;

L₂ es un enlace, -A₂-, o -A₂X²⁻;

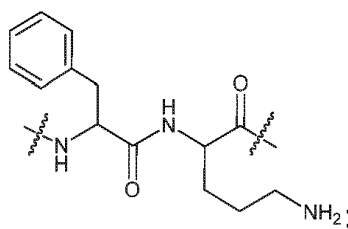
5 L₃ es un enlace, -A₃-, o -A₃X²⁻;

A₁ es -C(=O)NH-, -NHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -
 (((C(R⁴)₂)_nO)_m), -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 10 C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -
 (C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, o-
 (O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

A₂ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m),
 15 -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NR⁴-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nS-, -(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH-, -(C(R⁴)₂)_nNH-, -
 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 20 (CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)NH(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-,
 (O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

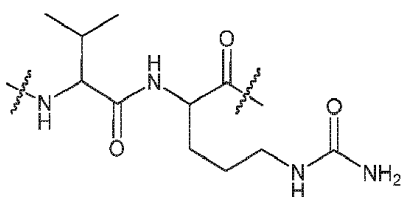


o

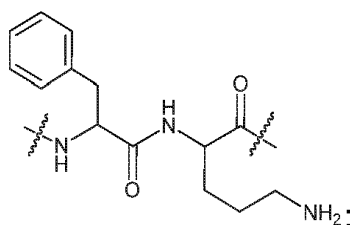


25

A₃ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m),
 -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nS-, -(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-,
 30 C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
 (CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)NH(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)-, -
 (C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)-, -(CH₂)_nO(CH₂)_n)_mC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nO(C(R⁴)₂)_n)_mC(=O)-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

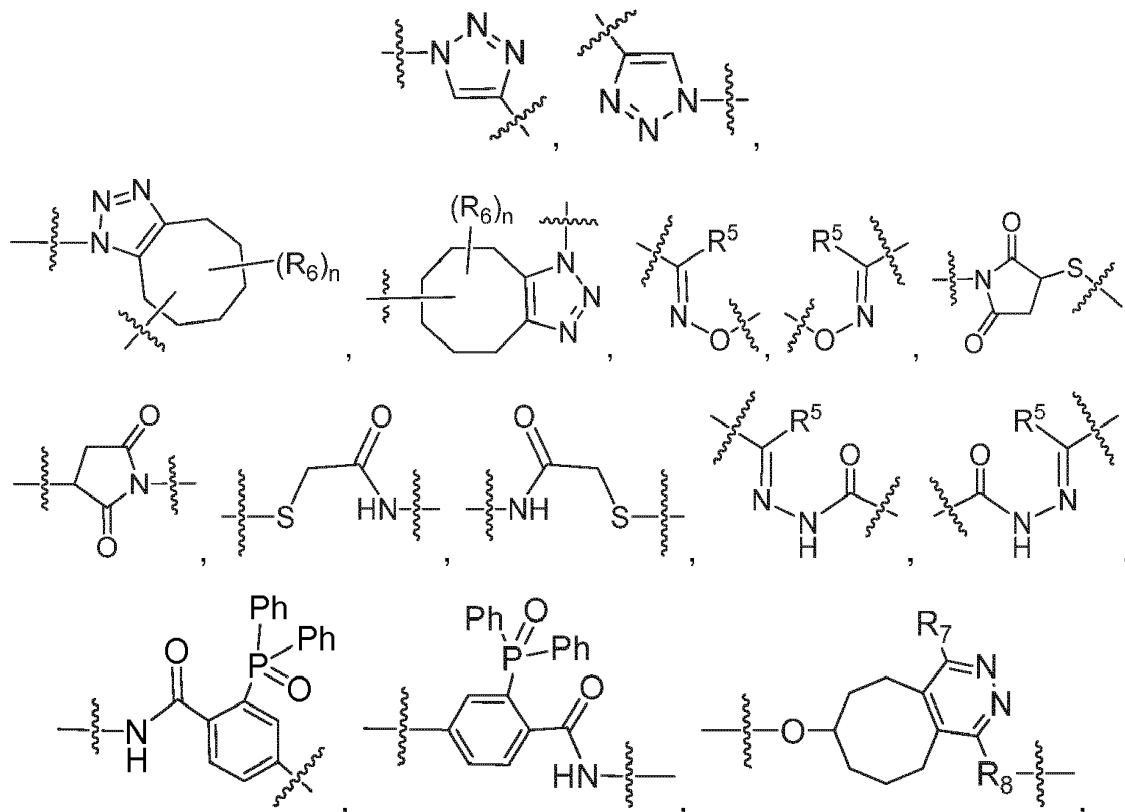


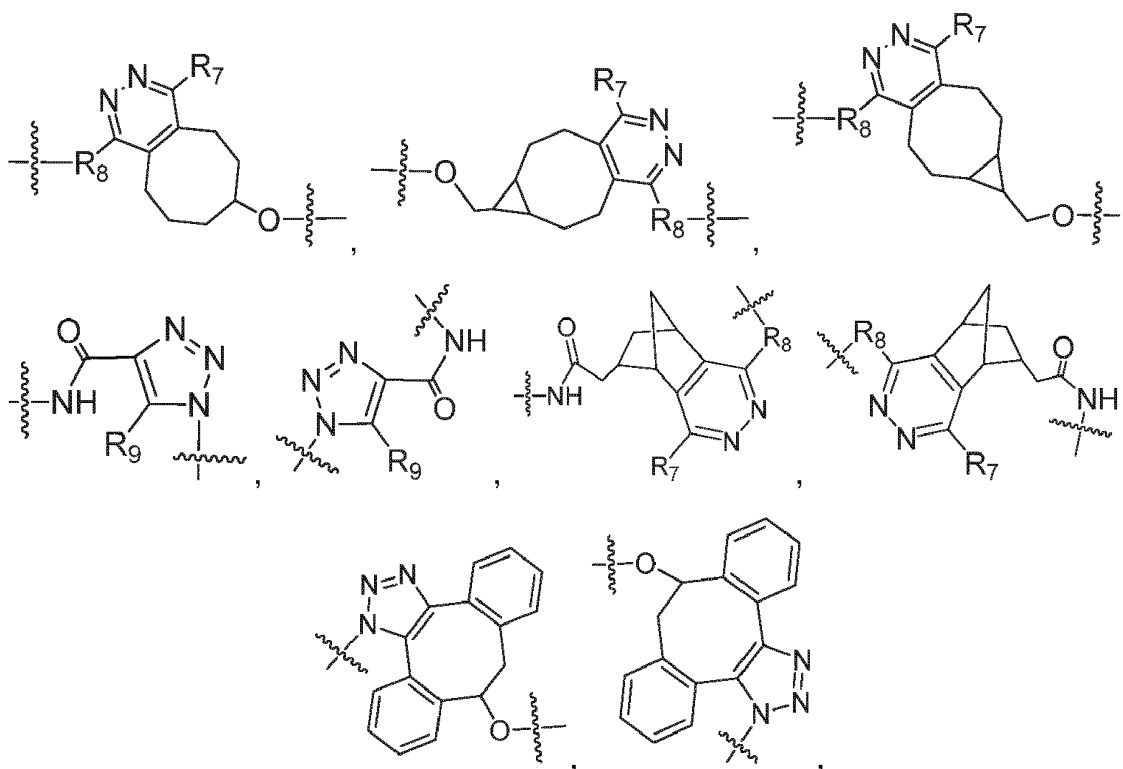
O



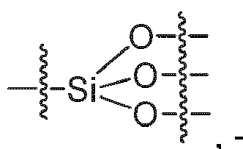
5 A₄ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -
((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -((((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n)-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-,
10 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -
C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-,
(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
10 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -
(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-;

cada X^2 se selecciona independientemente de un enlace,





-S-, -Si(OH)₂O-,



5

CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -C(=O)NH- y -NHC(=O)-;

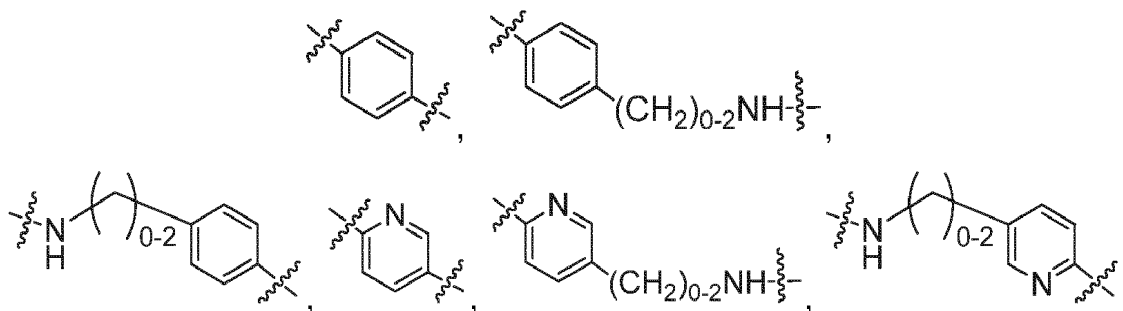
cada R⁴ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, -C(=O)OH y -OH,

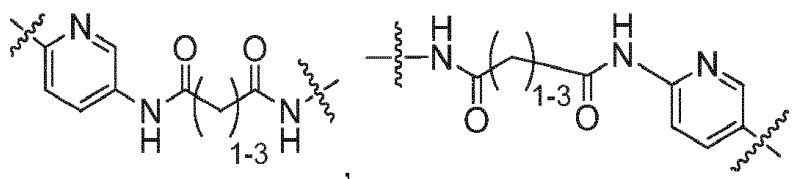
cada R⁵ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, fenilo o alquilo C₁₋₄ sustituido con 1 a 3 grupos OH;

10 cada R⁶ se selecciona independientemente de H, flúor, benciloxi sustituido con -C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

R⁷ se selecciona independientemente de H, fenilo y piridina;

R⁸ se selecciona independientemente de





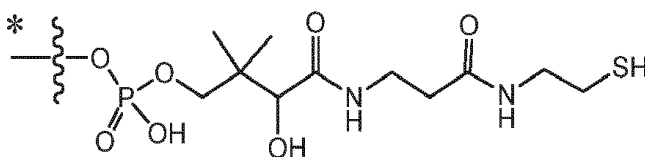
R⁹ se selecciona independientemente de H y haloalquilo C₁₋₆;

cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9,

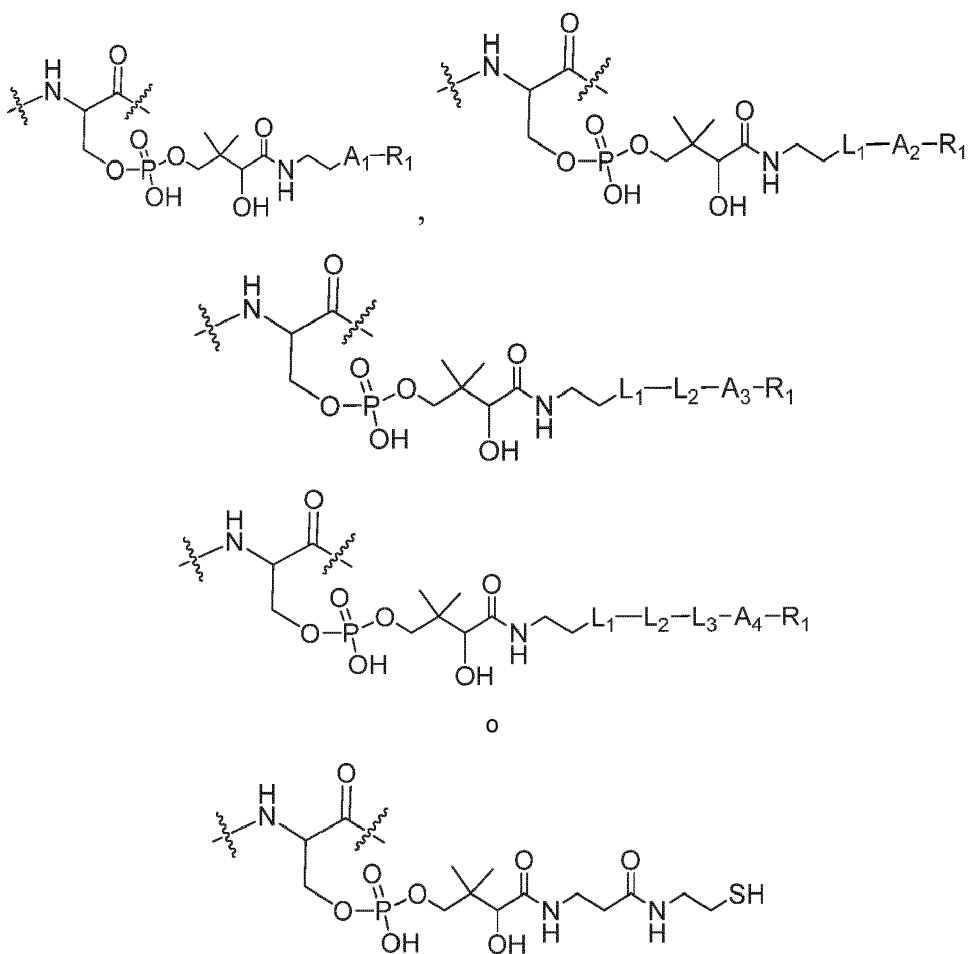
cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y

- 5 R¹ es un tiol, una maleimida, una haloacetamida, un alquino, una triaril fosfina, un cicloocteno, un oxanobornadieno, una azida, una diaril tetrazina, un norborneno, una monoaril tetrazina, una hidroxilamina, una hidrazina, NH₂-NH-C(=O)-, un aldehído o una cetona.

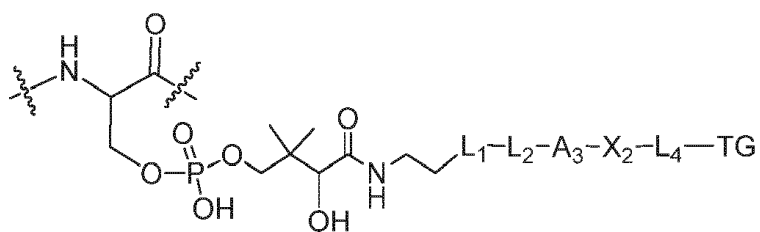
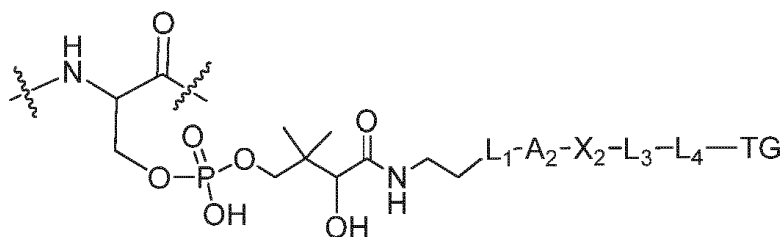
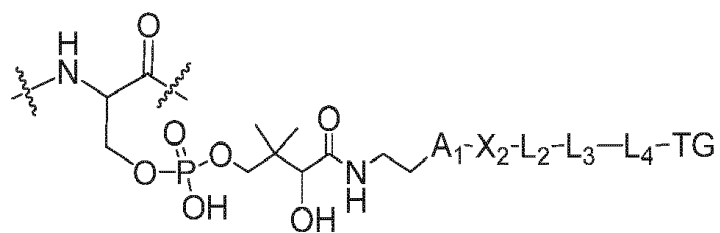
14. El immunoconjugado de la reivindicación 13, en donde el grupo 4'-fosfopanteteína es



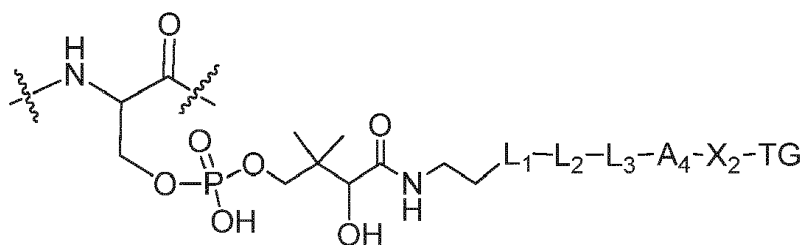
- 10 15. El immunoconjugado de la reivindicación 13, en donde la serina conjugada tiene una estructura seleccionada de:



- 15 16. Un immunoconjugado que comprende el anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde un residuo de serina de la etiqueta peptídica en dicho anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo está conjugado a un grupo 4'-fosfopanteteína modificado y tiene una estructura seleccionada de:



5 y



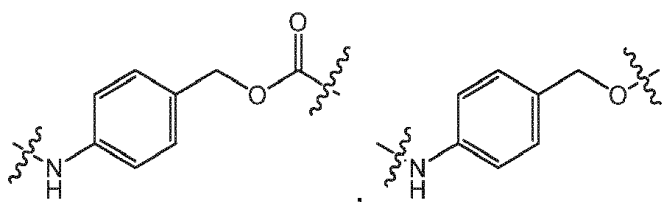
en donde

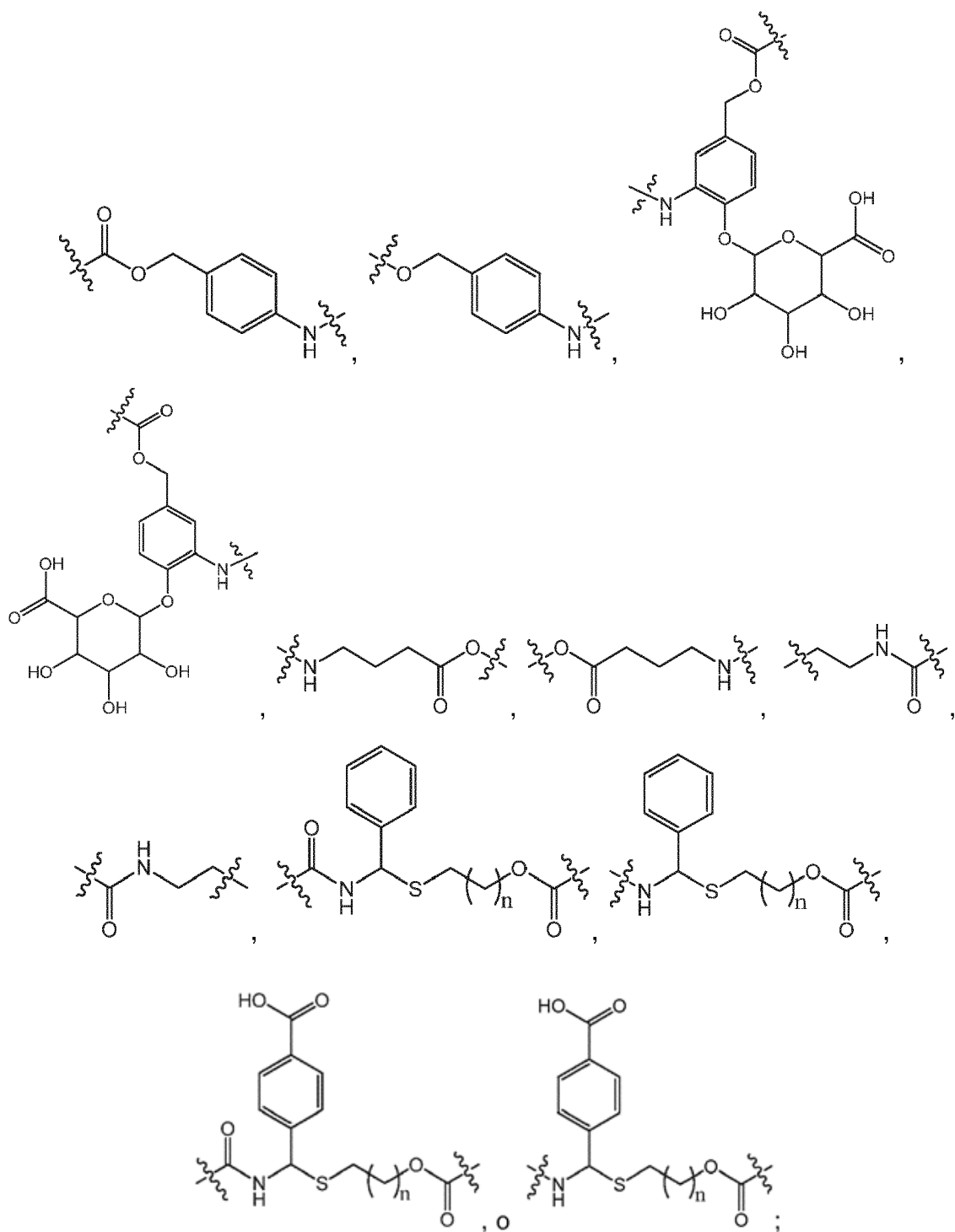
L₁ es -A₁X²- o -X²-;

L₂ es un enlace, -A₂-, o -A₂X²-;

10 L₃ es un enlace, -A₃-, o -A₃X²-;

L₄ es un enlace, -A₄-, -A₄X²-,

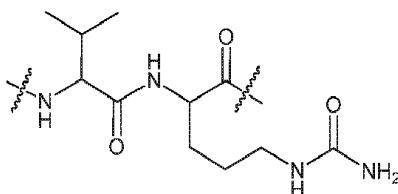




- 5 A₁ es -C(=O)NH-, -NHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -
 (((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
 -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -
 S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -
 C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_nO(CH₂)_nmNHC(=O)(CH₂)_n-, -
 (C(R⁴)₂)_nO(C(R⁴)₂)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -
 (CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, o-
 (O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n;

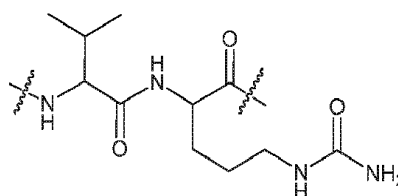
A₂ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -
 ((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NR⁴-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -

- 5 (C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-,
S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nS-, -(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH-, -(C(R⁴)₂)_nNH-,
C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)NH(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-,
(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,



o

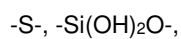
- 10
15 A₃ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-,
-((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-,
S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nS-, -(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-,
C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)NH(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)-,
(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mC(=O)-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,



o

- 20
25 A₄ es -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m-,
-((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -
(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-,
S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-,
(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,
(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-,
30 (O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-,

cada X² se selecciona independientemente de un enlace,



$\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{CHR}^4(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ y $-\text{NHC}(=\text{O})-$;

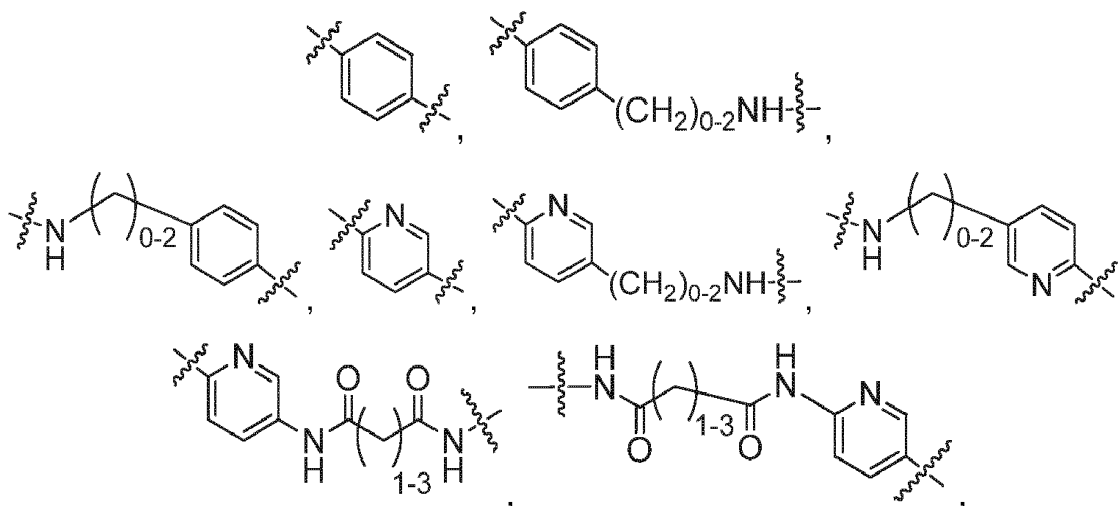
cada R^4 se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-4} , $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ y $-\text{OH}$,

cada R^5 se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-4} , fenilo o alquilo C_{1-4} sustituido con 1 a 3 grupos OH;

5 cada R^6 se selecciona independientemente de H, flúor, benciloxi sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, bencilo sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, alcoxi C_{1-4} sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ y alquilo C_{1-4} sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$;

R^7 se selecciona independientemente de H, fenilo y piridina;

R^8 se selecciona independientemente de



10

R^9 se selecciona independientemente de H y haloalquilo C_{1-6} ;

cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9,

cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y

15

TG es una unidad estructural de un fármaco, una sonda de afinidad, un quelante, una sonda espectroscópica, una sonda radioactiva, un reactivo de generación de imágenes, una molécula lipídica, un polietilenglicol, un polímero, una nanopartícula, un punto cuántico, un liposoma, una partícula de PLGA, un polisacárido, un grupo acetilo o una superficie.

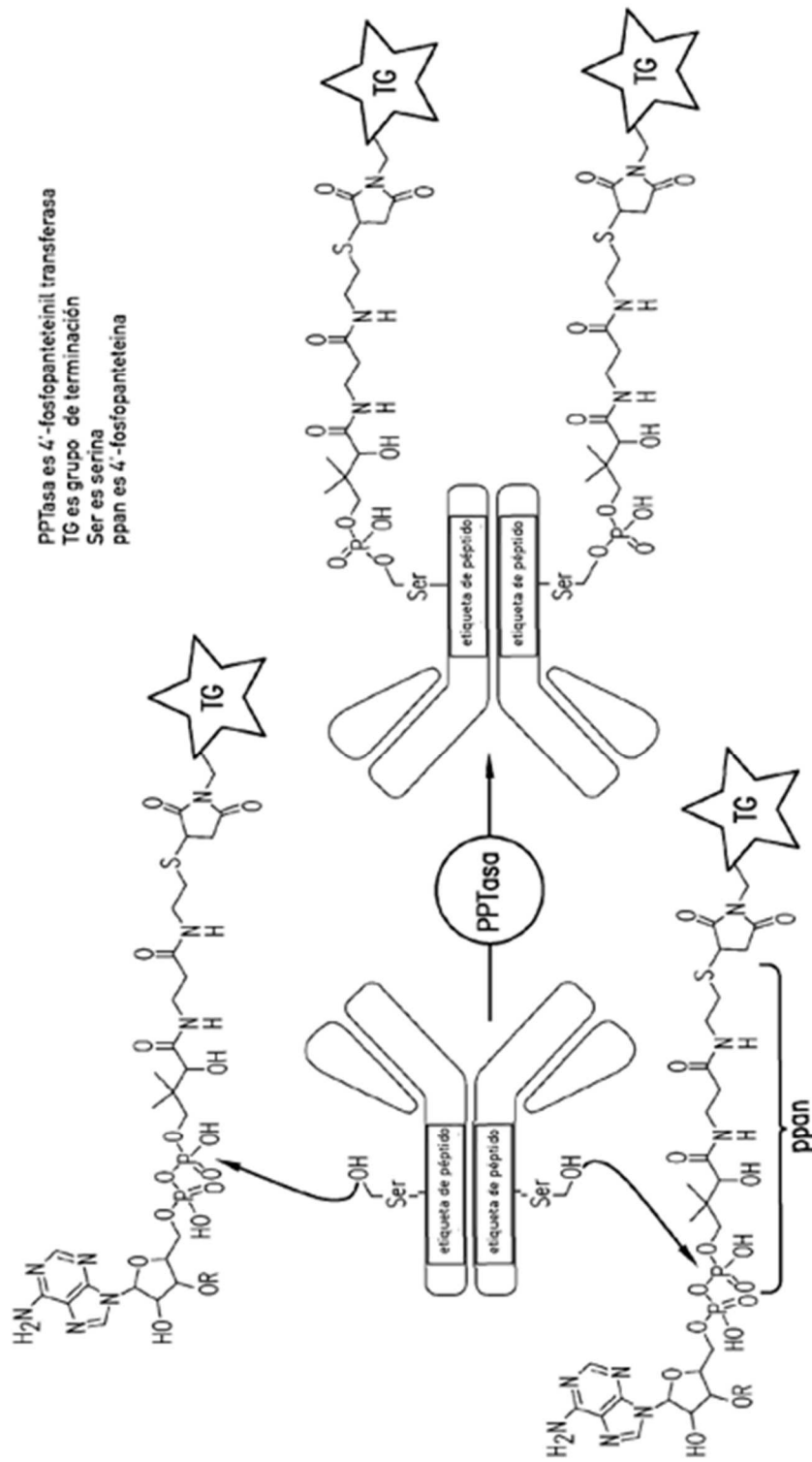


FIG.1

		expresión										conjugación	
		10	20	30	40	50	60	70	80	clonación	expresión		
SEQ ID NO: 1130	1	EV-----QLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFNI	KDTYI	HMVQA	PKGKL	EWARI	YPTNGYTRYADSV	KGRFI	68	+	+	+++	
SEQ ID NO: 94	1	EVGDSLWLLRLNQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFNI	KDTYI	HMVQA	PKGKL	EWARI	YPTNGYTRYADSV	KGRFI	80	+	+	+++	
SEQ ID NO: 95	1	EV--DSLEFIASKLAQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFNI	KDTYI	HMVQA	PKGKL	EWARI	YPTNGYTRYADSV	KGRFI	79	+	+	+++	
SEQ ID NO: 96	1	EVGDSLMLLENSLMQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFNI	KDTYI	HMVQA	PKGKL	EWARI	YPTNGYTRYADSV	KGRFI	80	+	+	n.d.	
		10	20	30	40	50	60	70	80				
SEQ ID NO: 1130	1	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFNI	KDTYI	HMVQA	PKGLEWARI	YPTNGYTRYADSV	-----KGRFI	SA	72				
SEQ ID NO: 99	1	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFNI	KDTYI	HMVQA	PKGLEWARI	YPTNGYTRYADSV	LEFIASKLAKGRFI	SA	80	+	+	++	
SEQ ID NO: 97	1	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFNI	KDTYI	HMVQA	PKGLEWARI	YPTNGYTRYADSV	LEFIASKV-KGRFI	SA	79	+	+	+	
SEQ ID NO: 98	1	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFNI	KDTYI	HMVQA	PKGLEWARI	YPTNGYTRYADSV	LEFIASKV-KGRFI	SA	77	+	+	++	
		120	130	140	150	160	170	180	190				
SEQ ID NO: 1130	119	STKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT	SWNSGAL	TSGVHTFPAVL	QSSGL	YSL	SSWTPVSSSL	GT	195				
SEQ ID NO: 100	119	STKGPSVFFLAPSGDSL	SWLTAALGCLVKDYFPEPVT	SWNSGAL	TSGVHTFPAVL	QSSGL	YSL	SSWTPVSSSL	GT	195	-	-	
SEQ ID NO: 102	119	STKGPSVFFLAPSDSLEFIASKLAGCLVKDYFPEPVT	SWNSGAL	TSGVHTFPAVL	QSSGL	YSL	SSWTPVSSSL	GT	195	+	+	-	
SEQ ID NO: 101	119	STKGPSVFFLAPSGDSL	SWLLRLNCLVKDYFPEPVT	SWNSGAL	TSGVHTFPAVL	QSSGL	YSL	SSWTPVSSSL	GT	195	-	-	
SEQ ID NO: 105	119	STKGPSVFFLAPSSKGDLS	SWLALGCLVKDYFPEPVT	SWNSGAL	TSGVHTFPAVL	QSSGL	YSL	SSWTPVSSSL	GT	195	+	-	
SEQ ID NO: 107	119	STKGPSVFFLAPSSKGDLS	SWLLRLNCLVKDYFPEPVT	SWNSGAL	TSGVHTFPAVL	QSSGL	YSL	SSWTPVSSSL	GT	195	+	-	

continuación en Fig.2A-1

FIG.2A

continuación de Fig.2A

SEQ ID NO:1130	120	130	140	150	160	170	180	190			
119	STKGPSVFPLAPSSKSTSGG-----TAAGCL	VKDYFPEPTVSMNSGAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSLSSWT	187						
SEQ ID NO:108	119	STKGPSVFPLAPSSKSGDSL	SWLLRLN--AALGCL	VKDYFPEPTVSMNSGAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSLSSWT	194		-	-	-
SEQ ID NO:103	119	STKGPSVFPLAPSSKSGDSL	SWLLRLN--TAAGCL	VKDYFPEPTVSMNSGAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSLSSWT	193		+	+	+
SEQ ID NO:106	119	STKGPSVFPLAPSSKSGDSL	SWLLRLN---ALGCL	VKDYFPEPTVSMNSGAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSLSSWT	192		+	+	-
SEQ ID NO:1130	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTVPSSS-----LGQTYI	CNNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	228				
SEQ ID NO:118	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTVPSSSGDSL	SWLLRLN-----	CNNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	233		-	-
SEQ ID NO:110	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTGDSL	SWLLRLN---QTYI	CNNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	233		+	+
SEQ ID NO:113	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTVPGDSL	SWLLRLN-----YI	CNNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	232		+	++
SEQ ID NO:1130	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTVPSSSLGTQTYI	CNNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	237				
SEQ ID NO:119	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTVPSSSGDSL	SWLLRLNKNPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	237		+	-	-
SEQ ID NO:109	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTGDSL	SWLQTYI	CNNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	237		+	+
SEQ ID NO:112	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTVDSEF	IASKLACNNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	237		+	+	-
SEQ ID NO:111	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTGDSL	SWLLRLNKNPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	237		+	-	-
SEQ ID NO:114	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTVPDSLEF	IASKLACNNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	237		+	+	-
SEQ ID NO:115	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTVPDSLEF	IASKLACNNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	237		+	-	-
SEQ ID NO:116	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTVPDSLEF	IASKLACNNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	237		+	+	-
SEQ ID NO:117	161	GAL	TSQVHIFPAVLQSSGL	YSL	SSWTVPSSSGDSL	SWLLRLNKNPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP	237		+	+	-

continuación en Fig.2A-2

FIG.2A-1

continuación de Fig.2A-1

SEQ ID NO:1130	321	CKVSNKALPAPI	EKTI	SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL	TCLWKGFYPSDI	AVENESNGQPENNYKTTTPPV	397		
SEQ ID NO:123	321	CKVSNKALPAPI	EKTI	SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMGDSLSWL	TCLWKGFYPSDI	AVENESNGQPENNYKTTTPPV	397	+	+
SEQ ID NO:120	321	CKVSNKALPAPI	EKTI	SKAKGQPREPQVYTLPPSREGDSLSWL	TCLWKGFYPSDI	AVENESNGQPENNYKTTTPPV	397	+	-

n.d. = no determinado

FIG.2A-2

continuación de Fig.2B

SEQ ID NO: 1130	387	PE	390	400	410	420	430	440	450	460	470			
SEQ ID NO: 127	387	PE	390	400	410	420	430	440	450	460	470	+	+	+++
SEQ ID NO: 126	387	PE	390	400	410	420	430	440	450	460	470	+	+	-
SEQ ID NO: 129	387	PE	390	400	410	420	430	440	450	460	470	+	+	+++
SEQ ID NO: 131	387	PE	390	400	410	420	430	440	450	460	470	+	+	++
SEQ ID NO: 130	387	PE	390	400	410	420	430	440	450	460	470	+	+	+++
SEQ ID NO: 132	387	PE	390	400	410	420	430	440	450	460	470	+	+	n.d.
SEQ ID NO: 136	387	PE	390	400	410	420	430	440	450	460	470	+	-	-
SEQ ID NO: 1130	380	EME	380	390	400	410	420	430	440	450	460			
SEQ ID NO: 140	380	EME	380	390	400	410	420	430	440	450	460	-	-	-
SEQ ID NO: 139	380	EME	380	390	400	410	420	430	440	450	460	-	-	-
SEQ ID NO: 141	380	EME	380	390	400	410	420	430	440	450	460	+	+	++

continuación en Fig.2B-2

FIG.2B-1

continuación de Fig.2B-1

SEQ ID NO:1131	1	DI-----QMTQSPSSLSASVGRVTI	TCRASQDVNTAVAWYQKPGKAPKLLI	YSASF	LYSGVPSRFS	SGSRSG	68			
SEQ ID NO:26	1	DIGDLSWLLRLNQMTPSPSSLSASVGRVTI	TCRASQDVNTAVAWYQKPGKAPKLLI	YSASF	LYSGVPSRFS	SGSRSG	80	+	-	-
SEQ ID NO:27	1	DI-DSLEFIASKLAQMTQSPSSLSASVGRVTI	TCRASQDVNTAVAWYQKPGKAPKLLI	YSASF	LYSGVPSRFS	SGSRSG	79	+	+	++
SEQ ID NO:1131	76	SSL-----QPEDFATYYCQGHYITPPTFGQGTKVEI	KRTVAAPSVF	I	FPPSDEQLKSGTASWCLLN	INFPYREAKVQWQVDN	152			
SEQ ID NO:30	76	DSLEFIASKLAQPEDFATYYCQGHYITPPTFGQGTKVEI	KRTVAAPSVF	I	FPPSDEQLKSGTASWCLLN	INFPYREAKVQWQVDN	160	+	+	-
SEQ ID NO:1131	150	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF	NRGEC-----	214						
SEQ ID NO:29	150	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF	NRGEC-DSLEFIASKLA	225				+	+	-
SEQ ID NO:28	150	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF	NRGEGDLSWLLRLN	226				+	+	-

FIG.2B-2

119	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGAL TSGVHTFPAVLQSS	177
178	GLYSSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ¹ VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG	237
238	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYV DG VEVHNAKTKPREEQYN	297
298	STYRWVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ² E	357
358	X ³ TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	417
418	QQGNV FSCSVMH ⁴ EX ⁴ LHNH YTKQSLSLSPG	446

FIG.3A

109	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWCLLNINFPREAKVQMKV DNX ⁵ LQSGNSQESVTEQDS	168
169	KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKX ⁶ YACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	214

FIG.3B

trastuzumab, región C de la cadena de lg gamma-1	119	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQI	197
P01857 [1-330], región C de la cadena de lg gamma-1, <i>Homo sapiens</i>	119	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQI	197
P01859 [1-326], región C de la cadena de lg gamma-2, <i>Homo sapiens</i>	119	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQI	197
P01860 [1-377], región C de la cadena de lg gamma-3, <i>Homo sapiens</i>	119	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQI	197
P01861 [1-327], región C de la cadena de lg gamma-4, <i>Homo sapiens</i>	119	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQI	197
trastuzumab, región C de la cadena de lg gamma-1	198	YTCNWNHGPSNITKVDKVE-----PKSCDKTHTCPPCP	230
P01857 [1-330], región C de la cadena de lg gamma-1, <i>Homo sapiens</i>	198	YTCNWNHGPSNITKVDKVE-----PKSCDKTHTCPPCP	230
P01859 [1-326], región C de la cadena de lg gamma-2, <i>Homo sapiens</i>	198	YTCNWNHGPSNITKVDKVE-----KCCVECP	227
P01860 [1-377], región C de la cadena de lg gamma-3, <i>Homo sapiens</i>	198	YTCNWNHGPSNITKVDKVELKPLGDTHTTCPPCPPEPKSCDTPPPCPPEPKSCDTPPPCP	277
P01861 [1-327], región C de la cadena de lg gamma-4, <i>Homo sapiens</i>	198	YTCNWNHGPSNITKVDKVES-----KYGPPCPSCP	227
trastuzumab, región C de la cadena de lg gamma-1	231	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTRYWSVLTVLH	310
P01857 [1-330], región C de la cadena de lg gamma-1, <i>Homo sapiens</i>	231	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTRYWSVLTVLH	310
P01859 [1-326], región C de la cadena de lg gamma-2, <i>Homo sapiens</i>	228	APPVAG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTRYWSVLTVH	306
P01860 [1-377], región C de la cadena de lg gamma-3, <i>Homo sapiens</i>	278	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTRYWSVLTVLH	357
P01861 [1-327], región C de la cadena de lg gamma-4, <i>Homo sapiens</i>	228	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTRYWSVLTVLH	307

continuación en Fig. 4A-1

FIG. 4A

continuación de Fig.4A

trastuzumab, región C de la cadena de Ig gamma-1	311	QDWLNCKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAGQPREPOVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVENESNGQPENN	390
P01857[1-330], región C de la cadena de Ig gamma-1, <i>Homo sapiens</i>	311	QDWLNCKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAGQPREPOVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVENESNGQPENN	390
P01859[1-326], región C de la cadena de Ig gamma-2, <i>Homo sapiens</i>	307	QDWLNCKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKAGQPREPOVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVENESNGQPENN	386
P01860[1-377], región C de la cadena de Ig gamma-3, <i>Homo sapiens</i>	358	QDWLNCKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAGQPREPOVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVENESNGQPENN	437
P01861[1-327], región C de la cadena de Ig gamma-4, <i>Homo sapiens</i>	308	QDWLNCKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAGQPREPOVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVENESNGQPENN	387
trastuzumab, región C de la cadena de Ig gamma-1	391	YKTIPTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNWFSCSVMHEALHNHYTKQKSLSLSPG	446
P01857[1-330], región C de la cadena de Ig gamma-1, <i>Homo sapiens</i>	391	YKTIPTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNWFSCSVMHEALHNHYTKQKSLSLSPG	446
P01859[1-326], región C de la cadena de Ig gamma-2, <i>Homo sapiens</i>	387	YKTIPTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNWFSCSVMHEALHNHYTKQKSLSLSPG	442
P01860[1-377], región C de la cadena de Ig gamma-3, <i>Homo sapiens</i>	438	YNTIPTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNWFSCSVMHEALHNHYTKQKSLSLSPG	493
P01861[1-327], región C de la cadena de Ig gamma-4, <i>Homo sapiens</i>	388	YKTIPTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNWFSCSVMHEALHNHYTKQKSLSLSLG	443

FIG.4A-1

trastuzumab región C de la cadena Ig kappa	109 <u>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWC</u> LN ^F YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK 188
P01834[1-106], región C de la cadena Ig kappa, <i>Homo sapiens</i>	109 <u>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWC</u> LN ^F YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK 188
trastuzumab región C de la cadena Ig kappa	189 <u>HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR</u> GEC 214
P01834[1-106], región C de la cadena Ig kappa, <i>Homo sapiens</i>	189 <u>HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR</u> GEC 214

FIG.4B

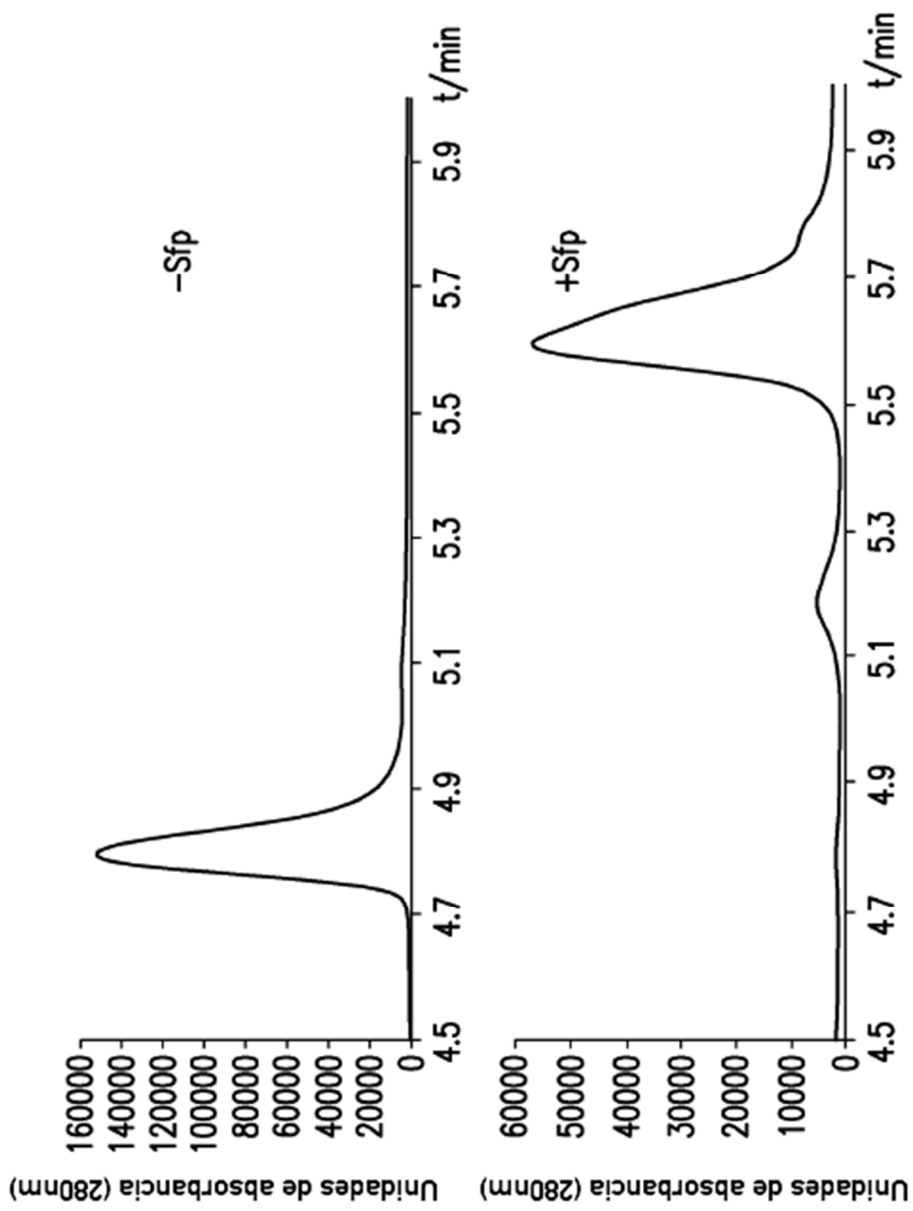


FIG.5A

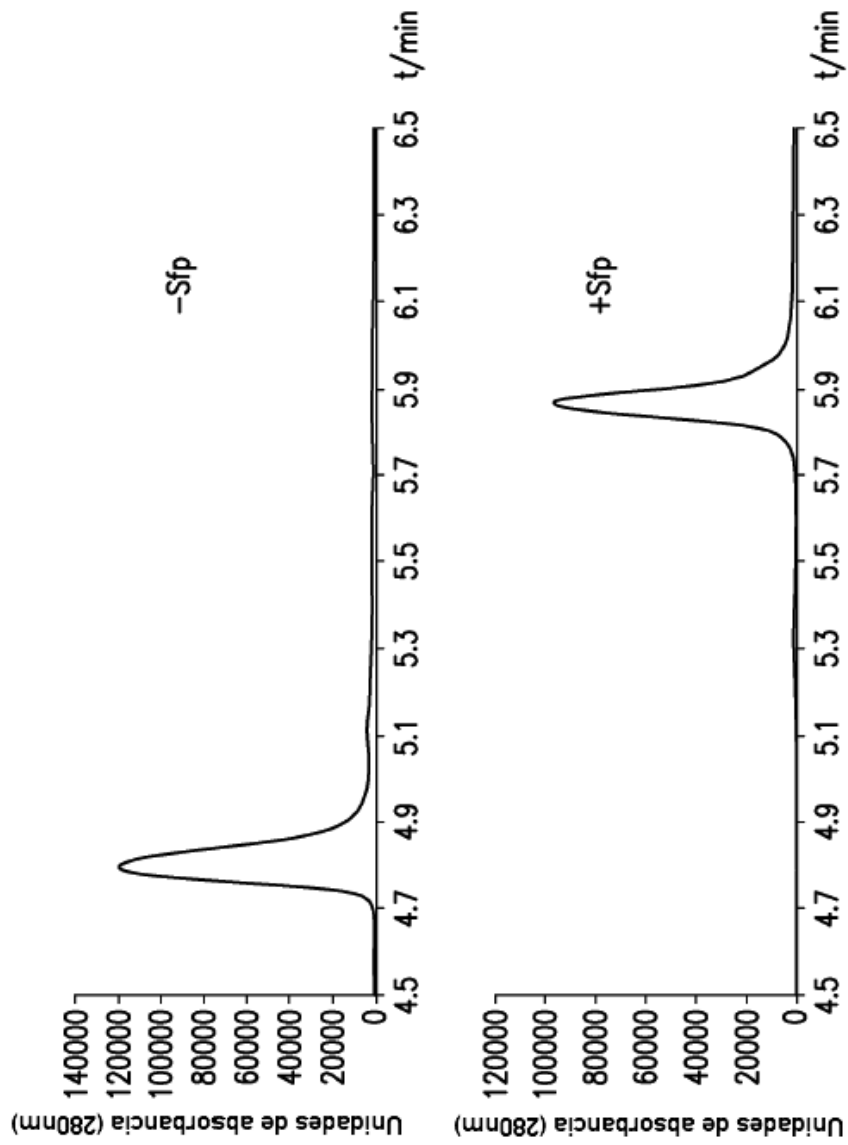


FIG.5B

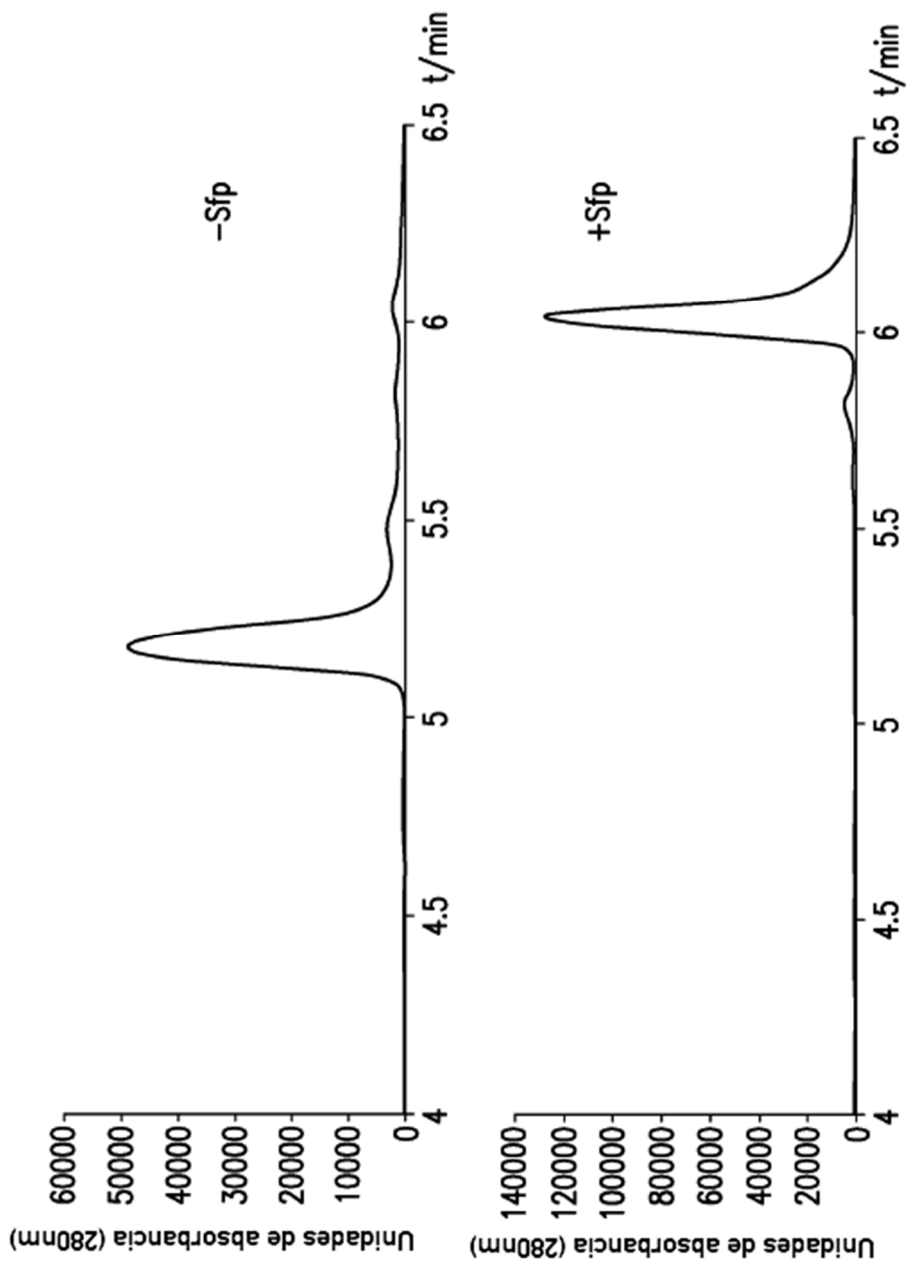


FIG.5C

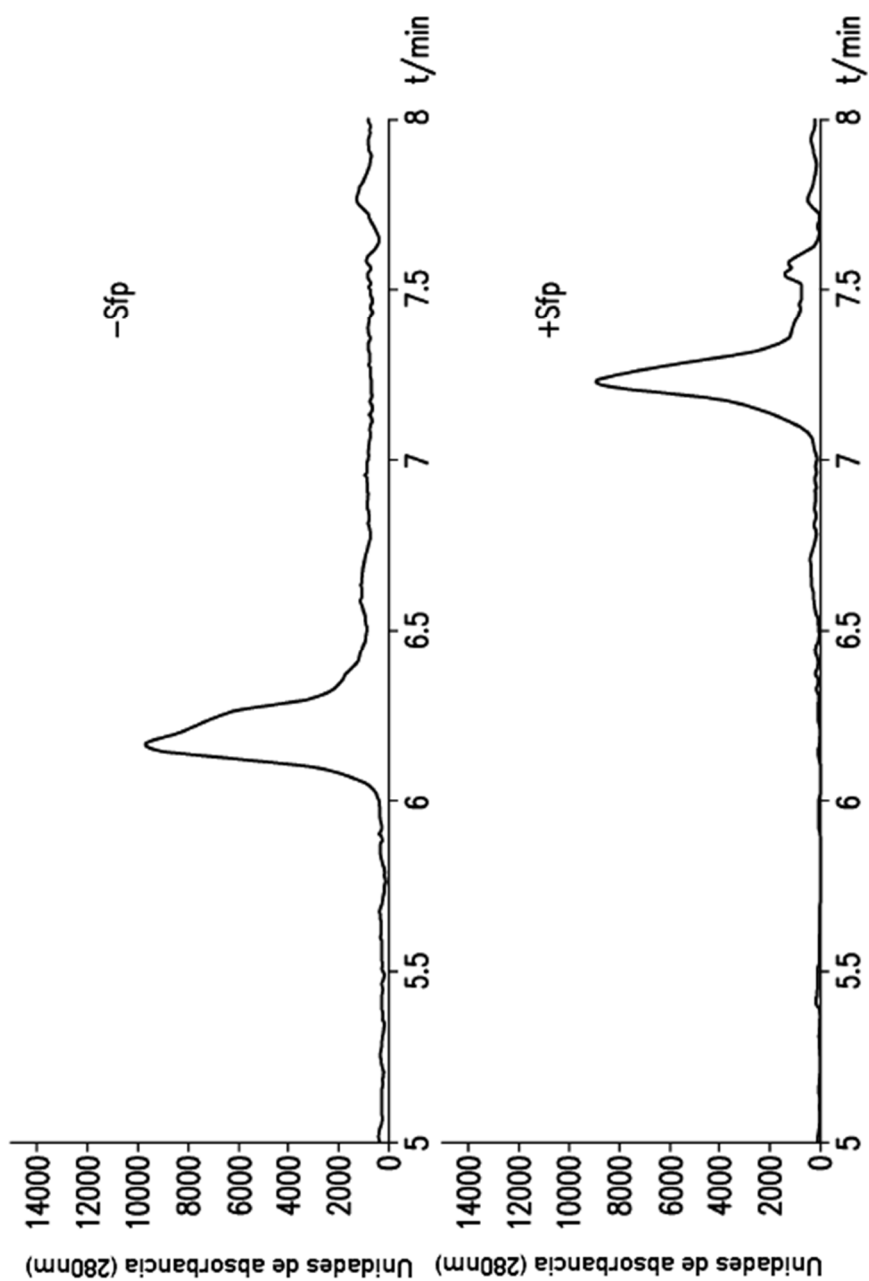


FIG.5D

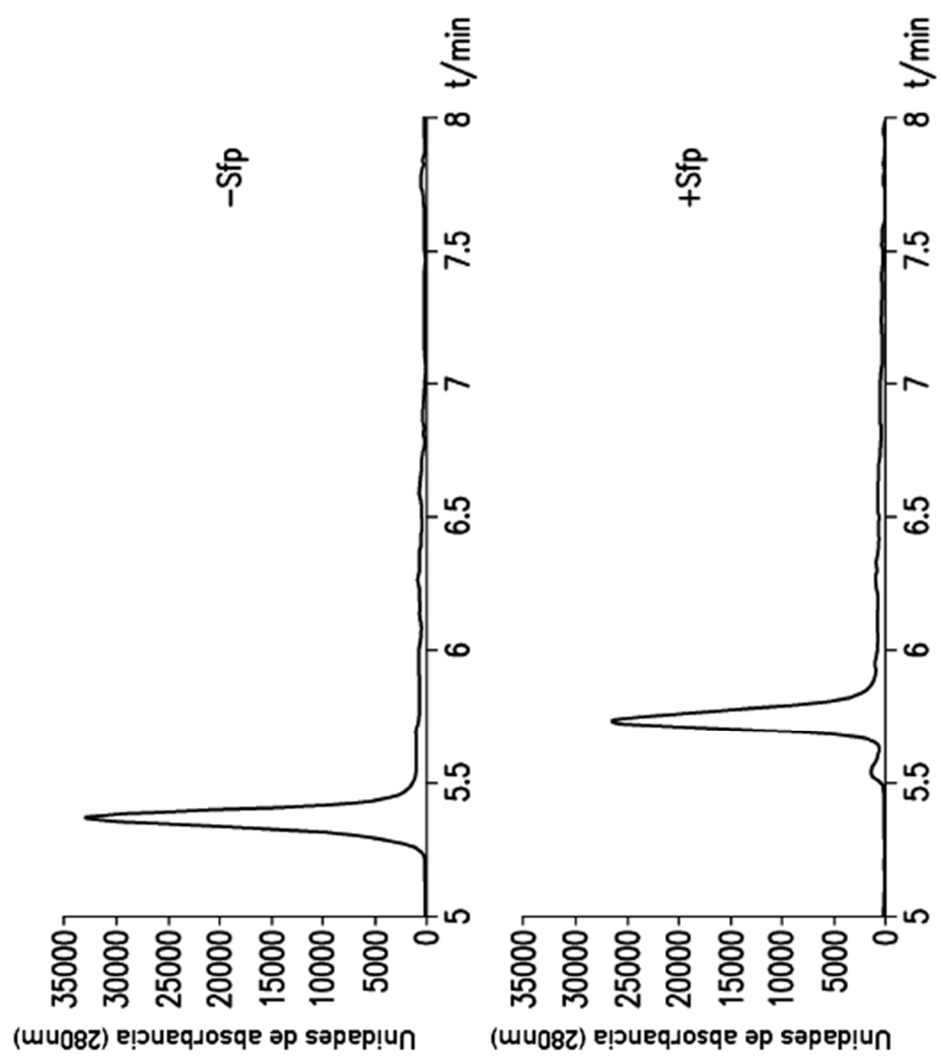


FIG.5E

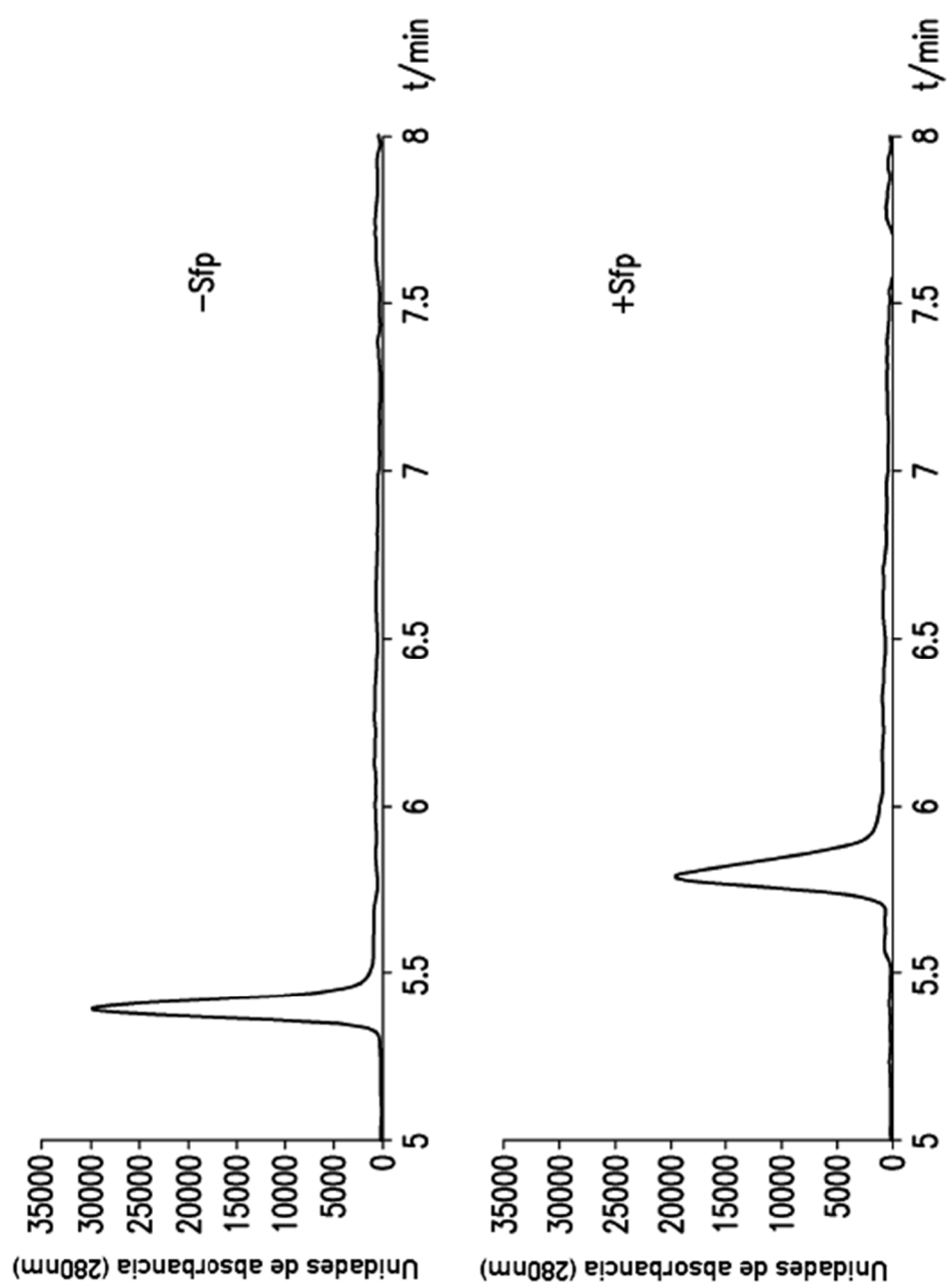


FIG.5F

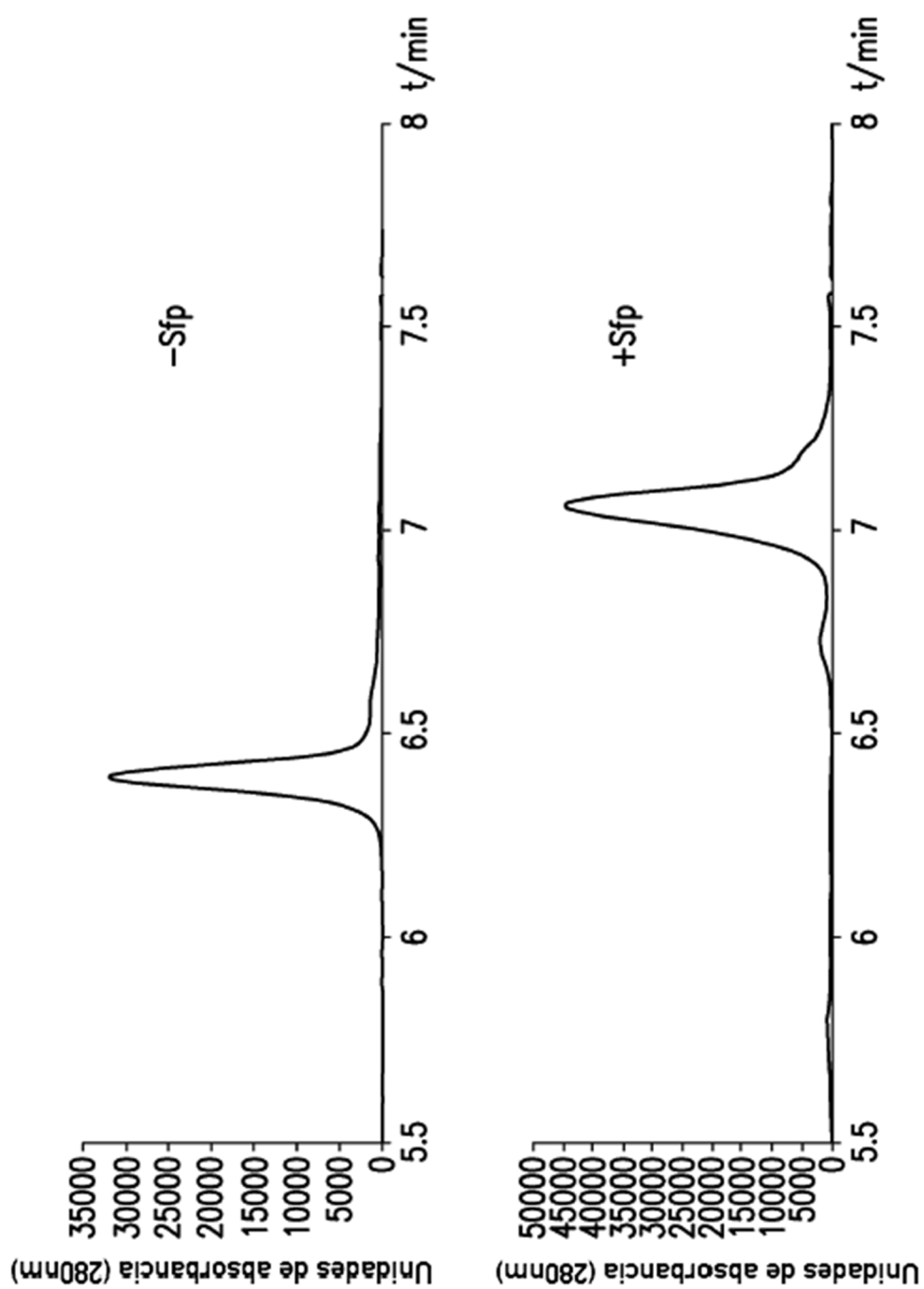


FIG.5G

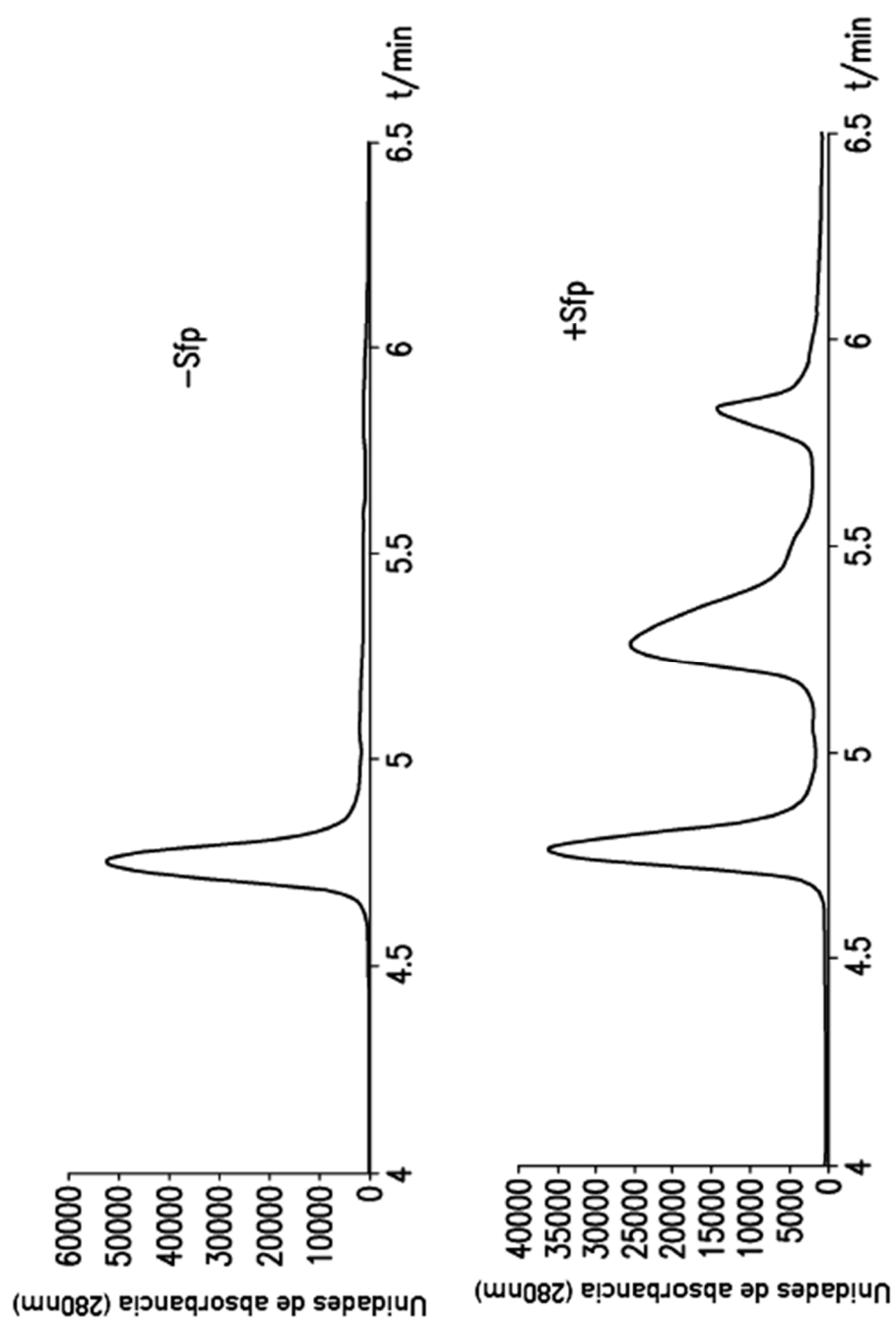


FIG.5H

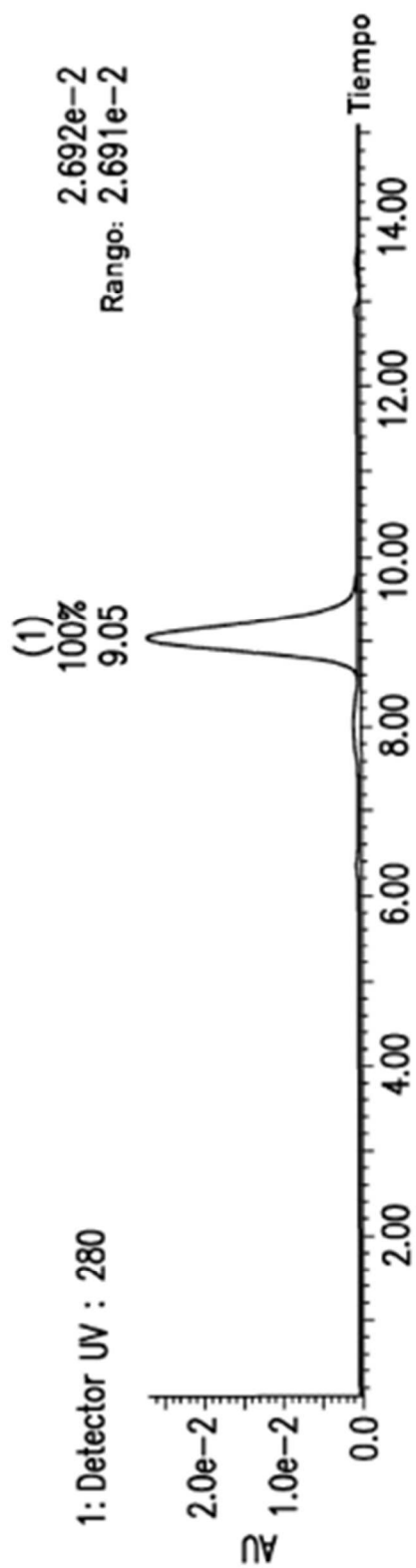


FIG. 6A

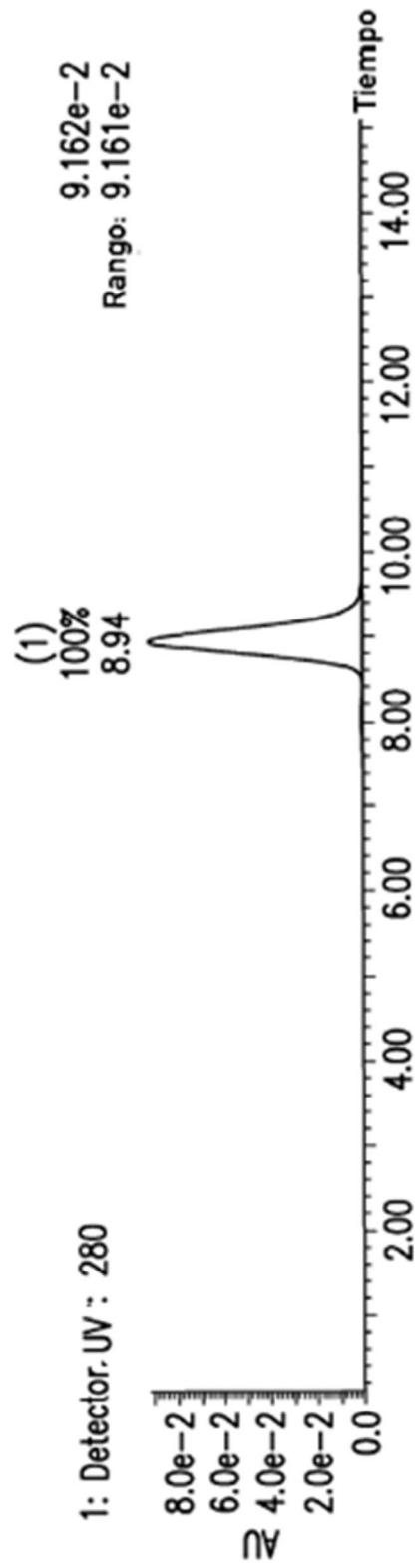


FIG. 6B

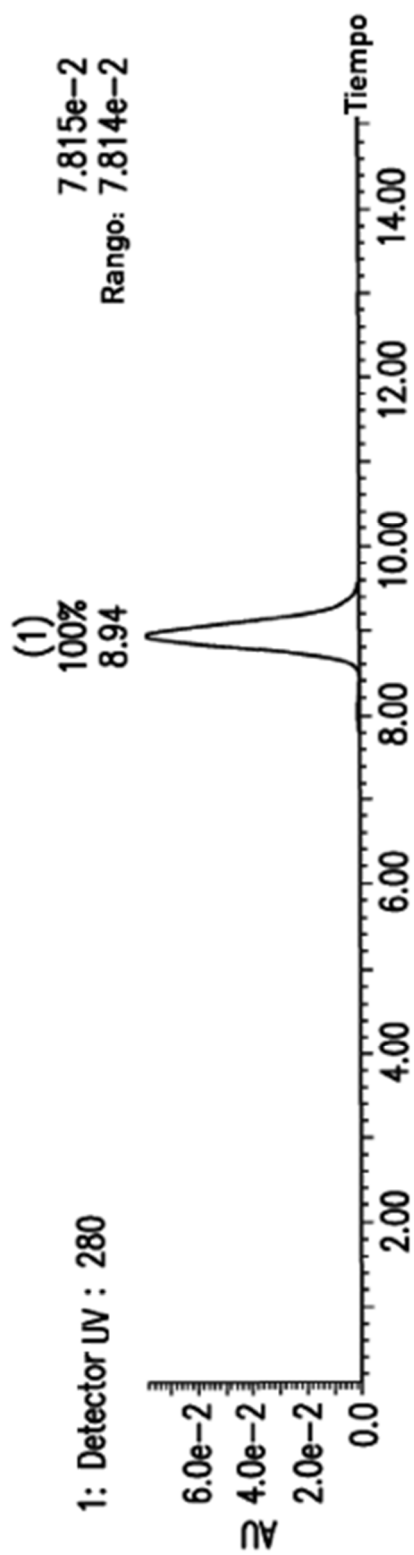


FIG.6C

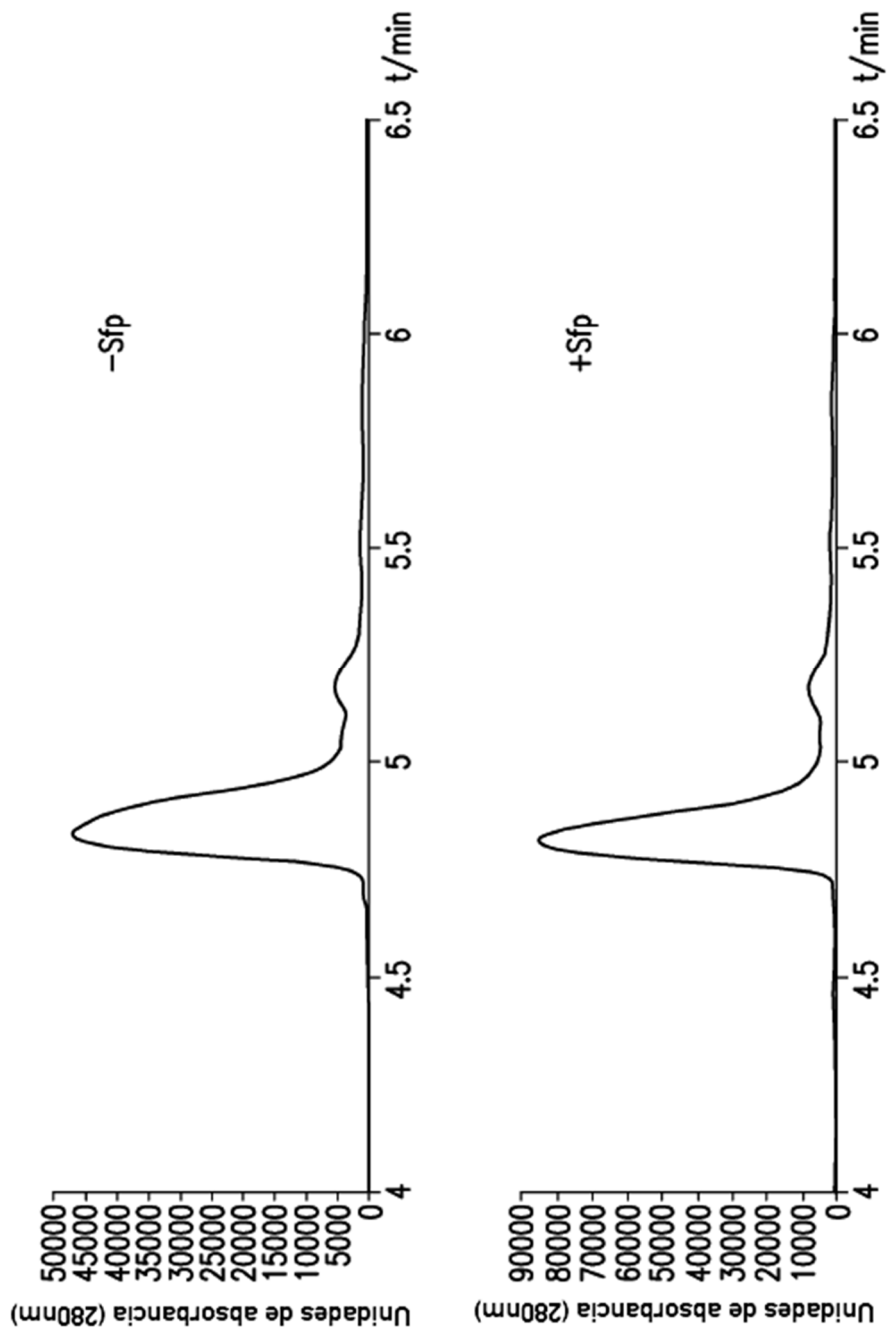


FIG.7

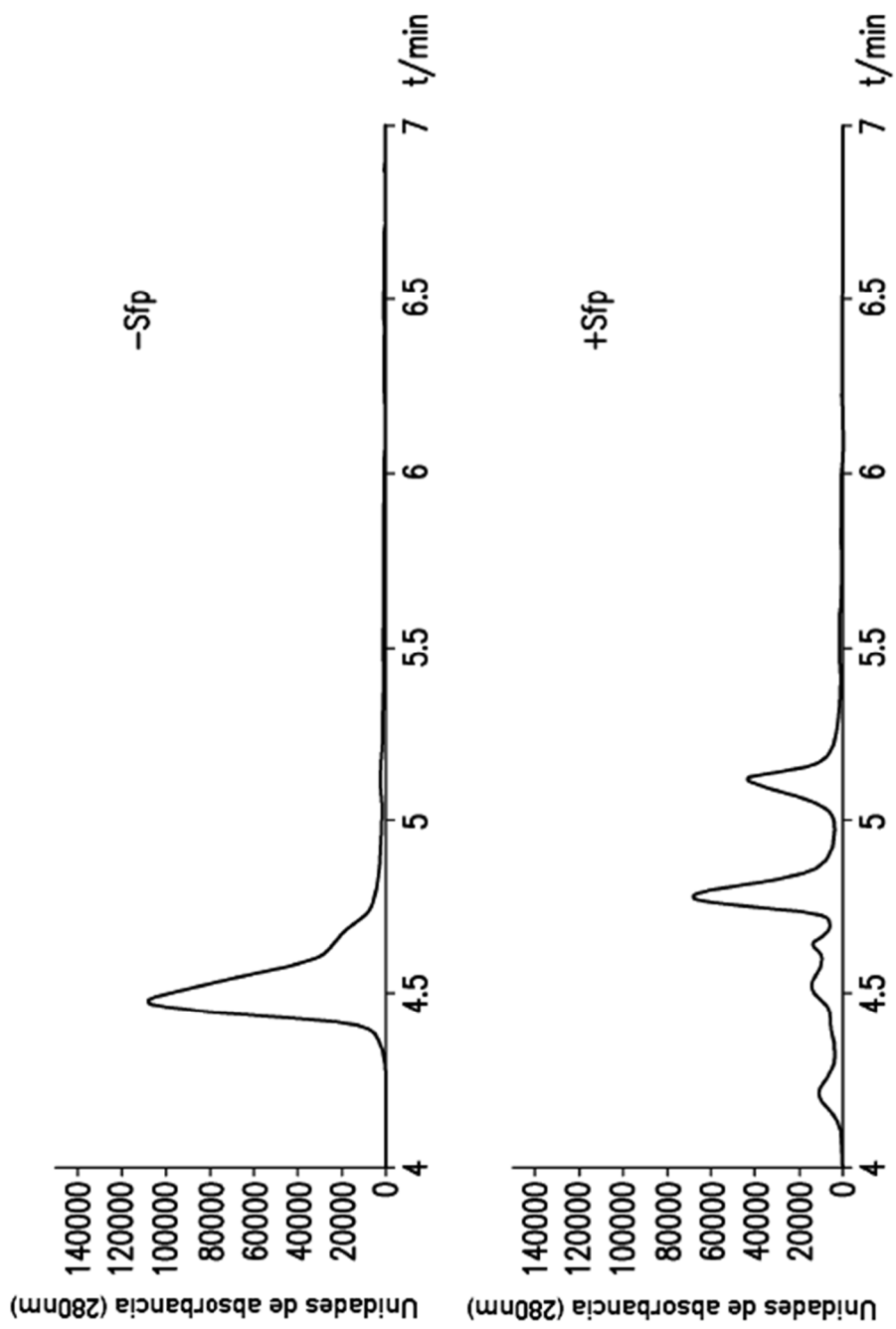


FIG.8A

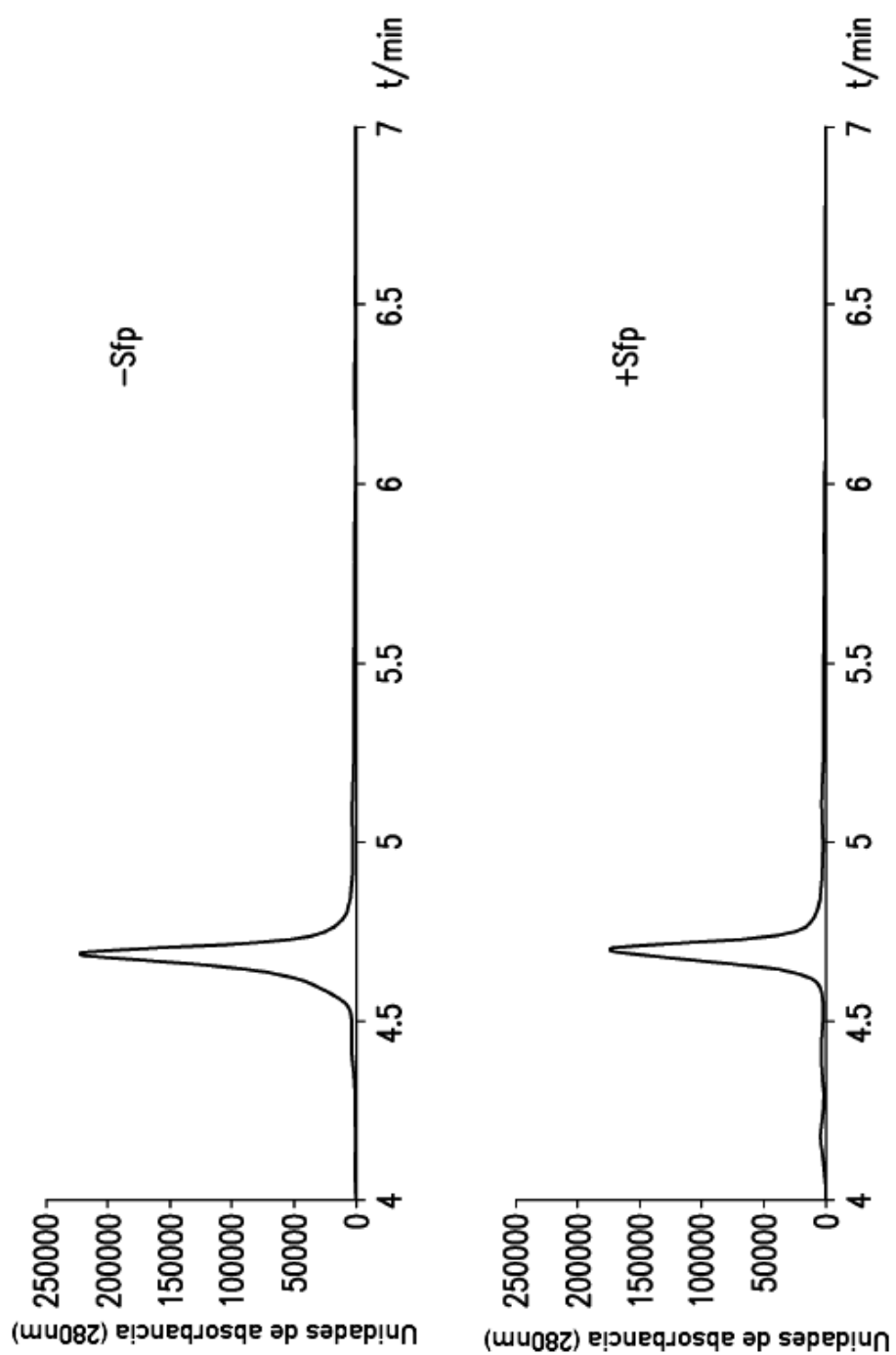


FIG.8B

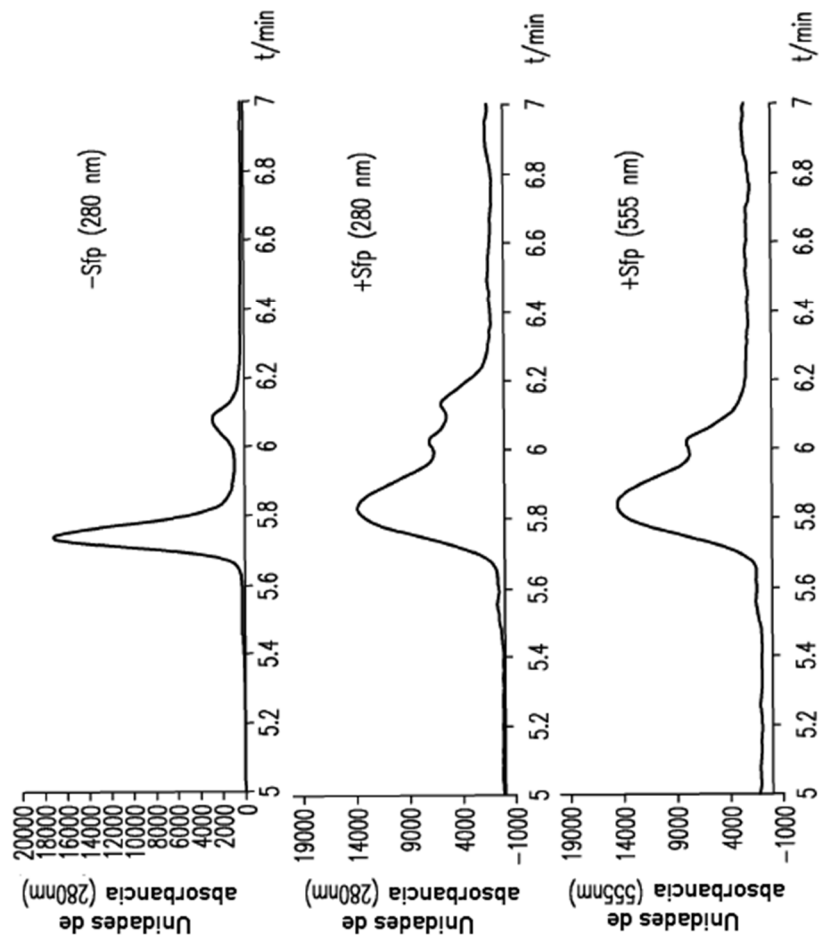


FIG.9A

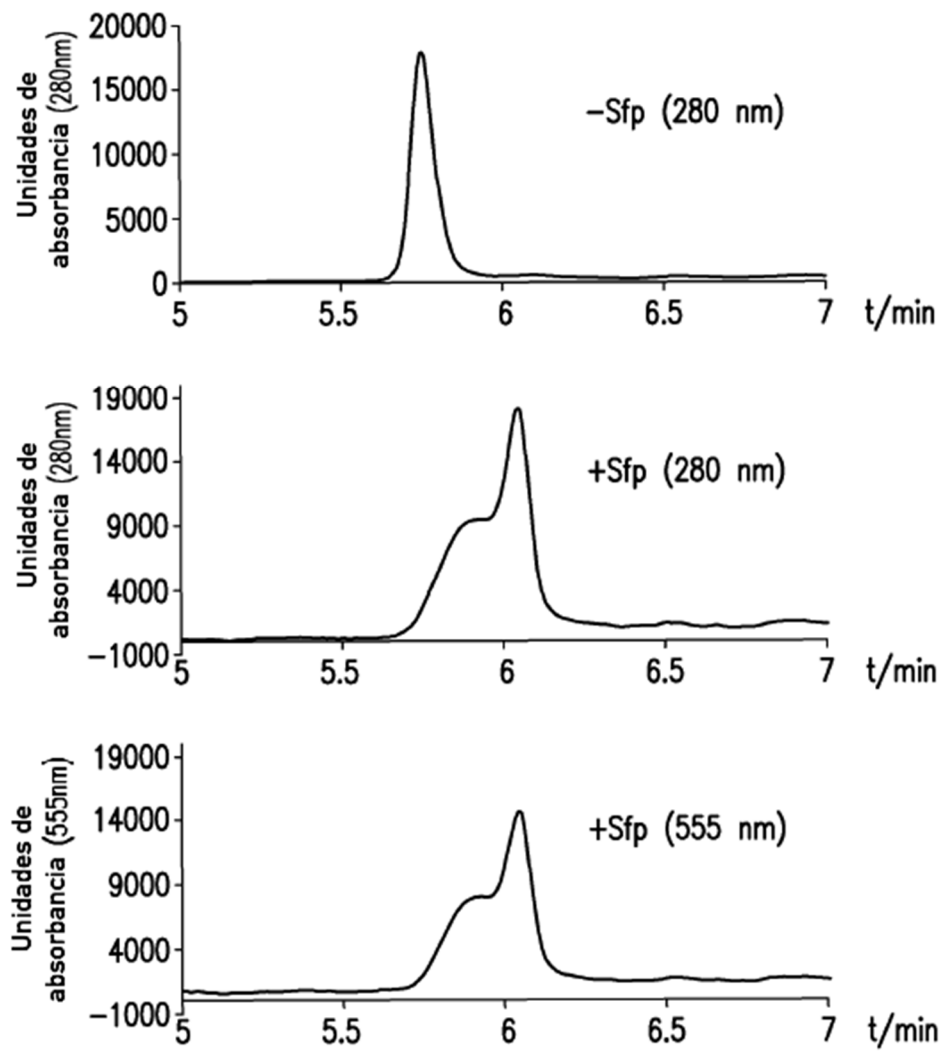


FIG.9B

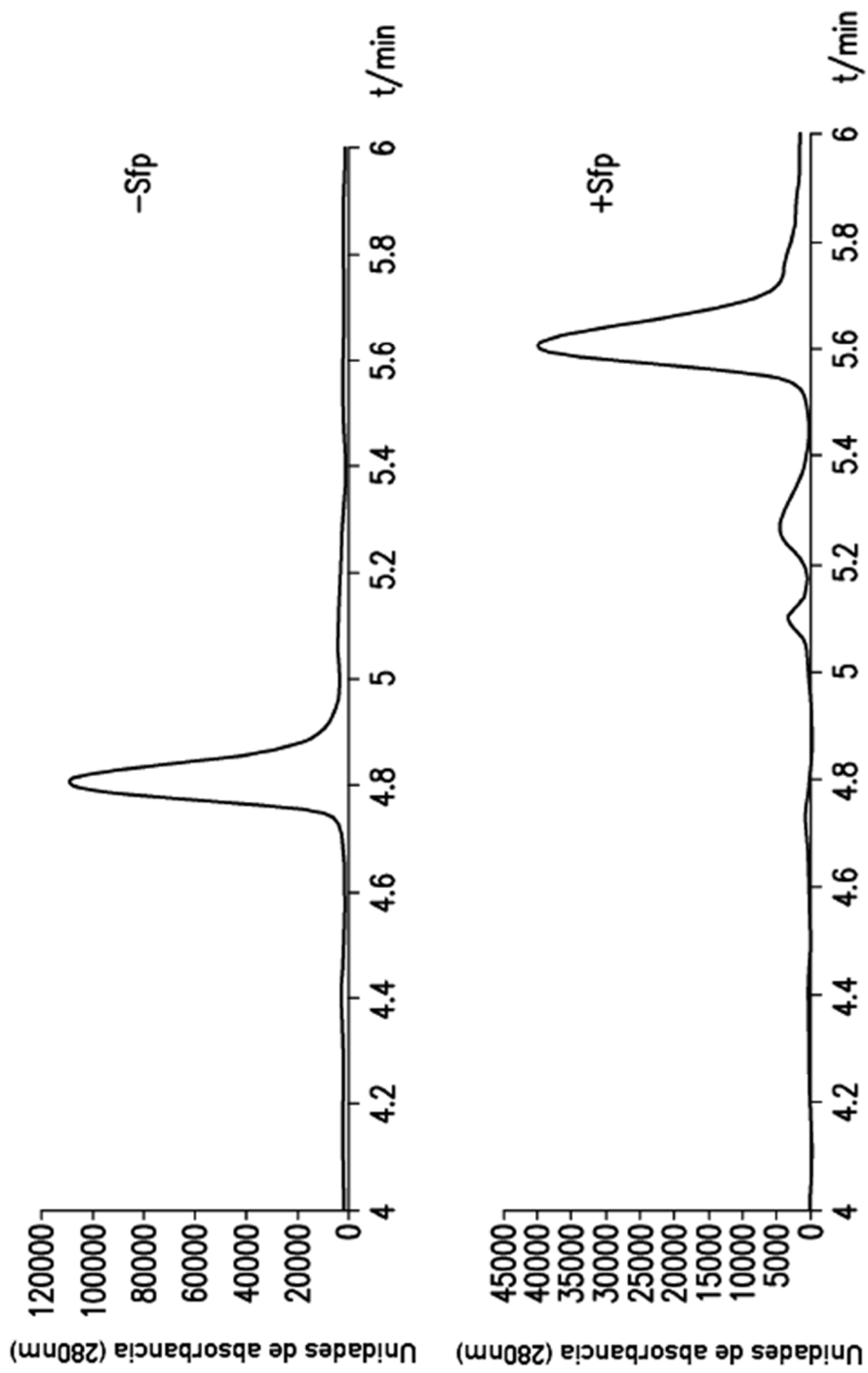


FIG.10A

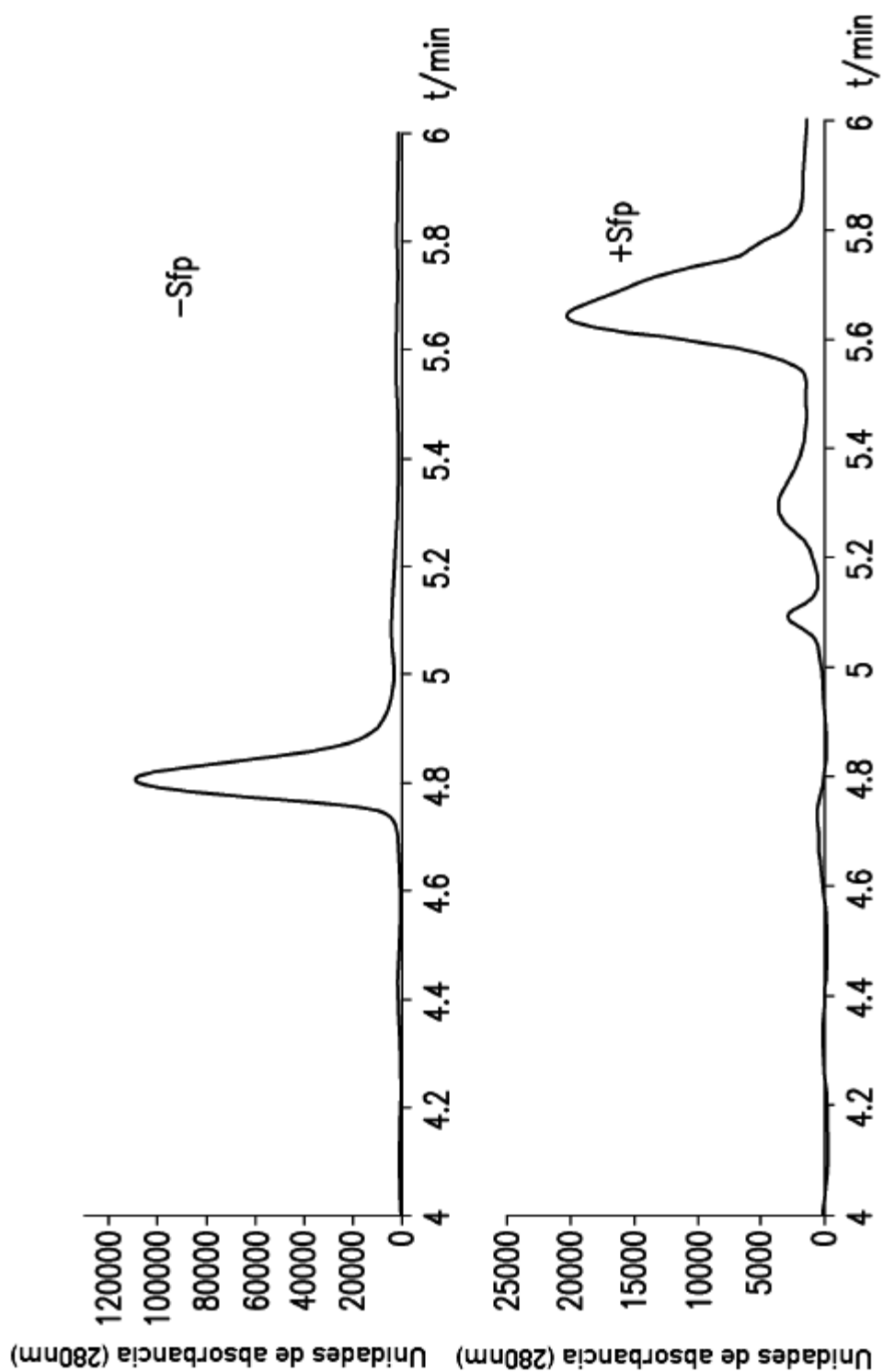


FIG.10B

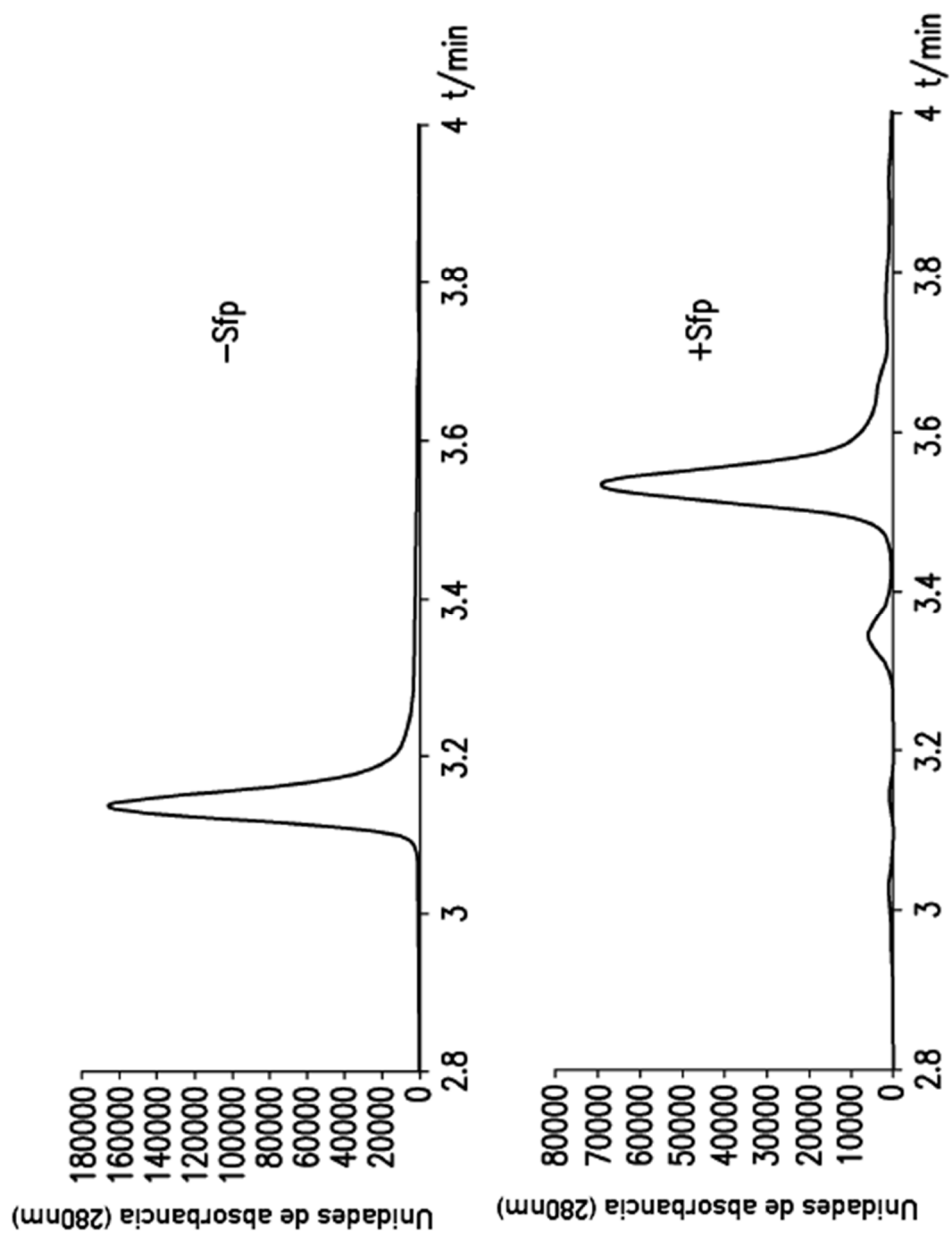


FIG.11A

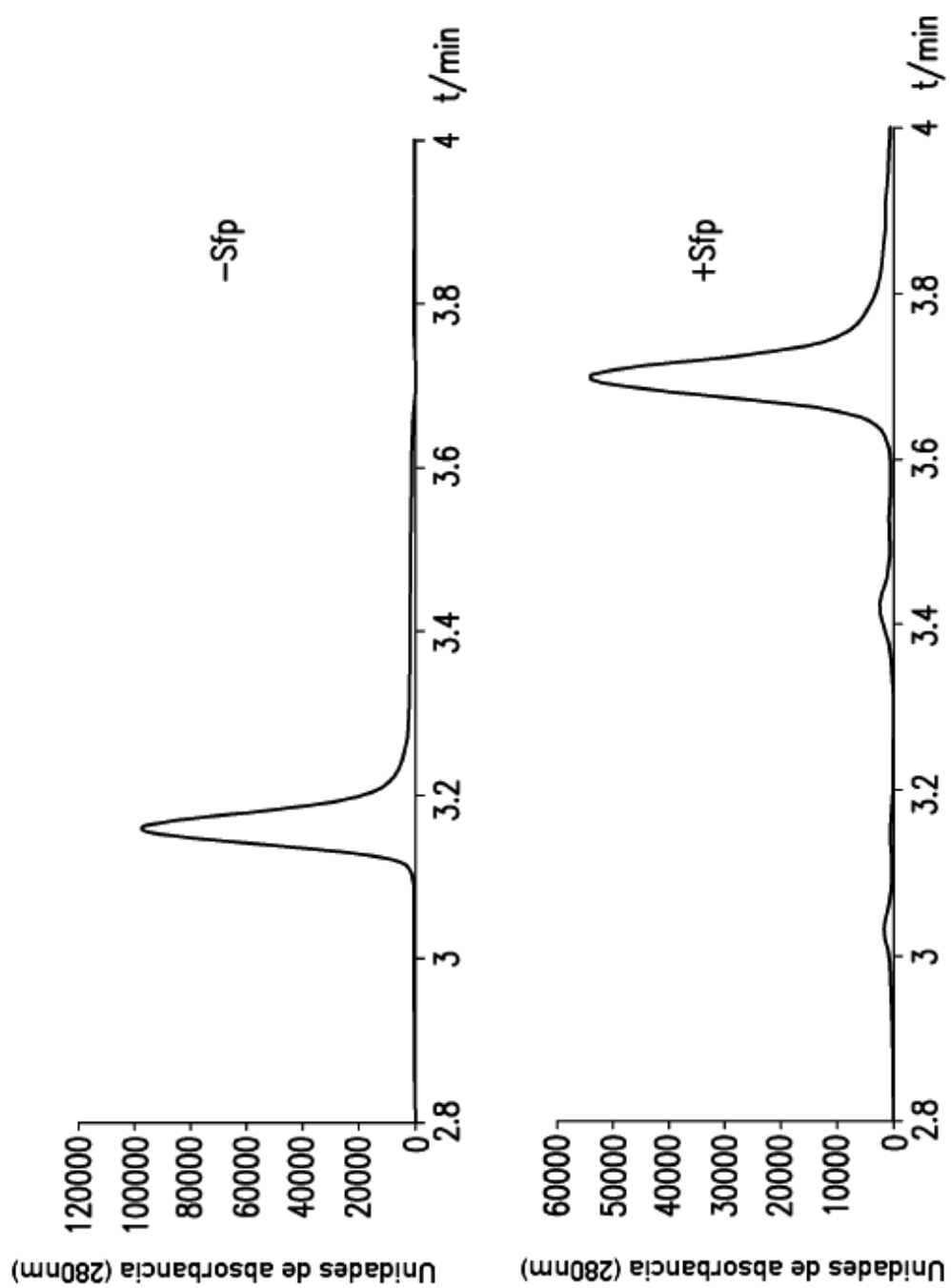


FIG.11B

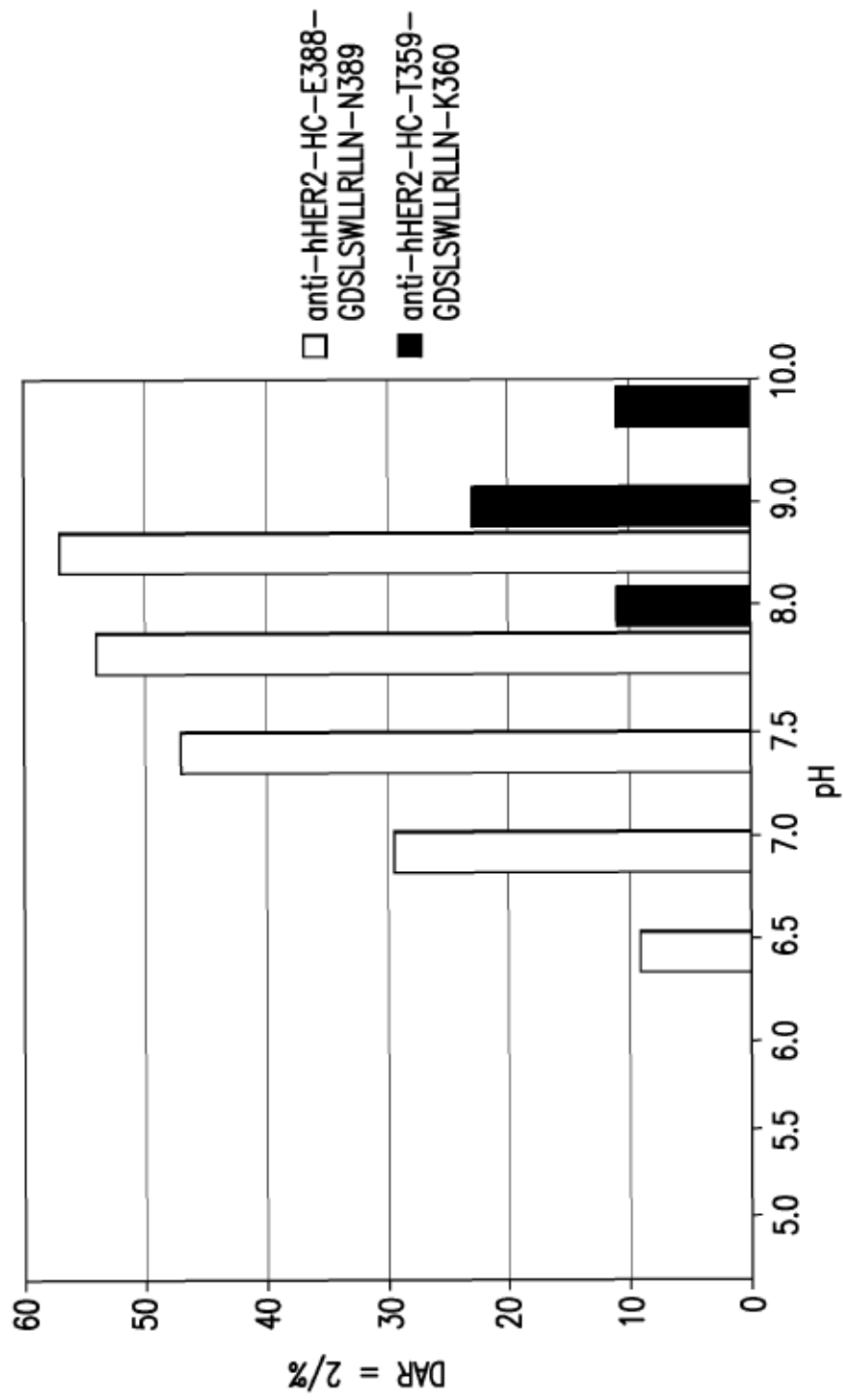


FIG.12

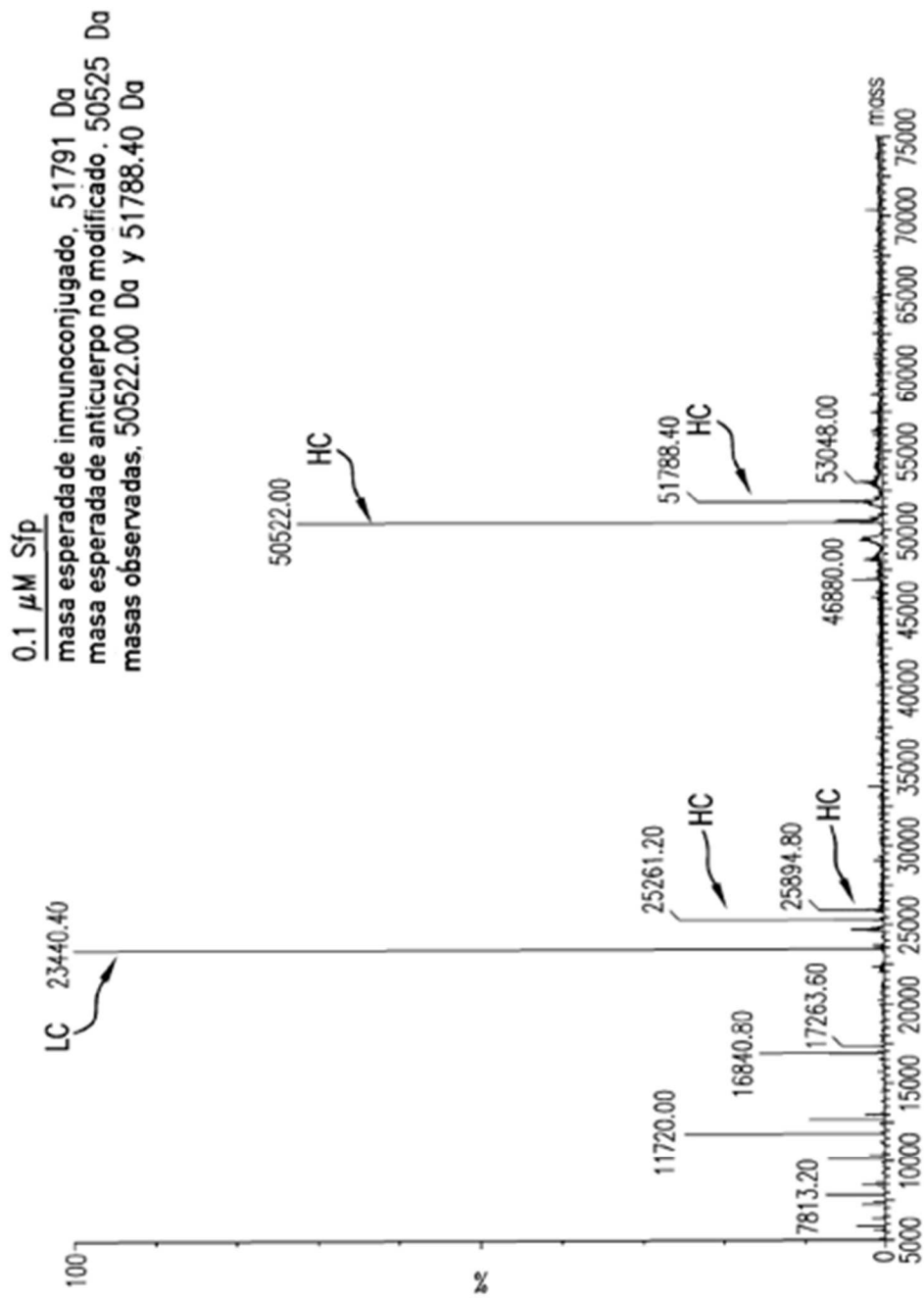


FIG.13A

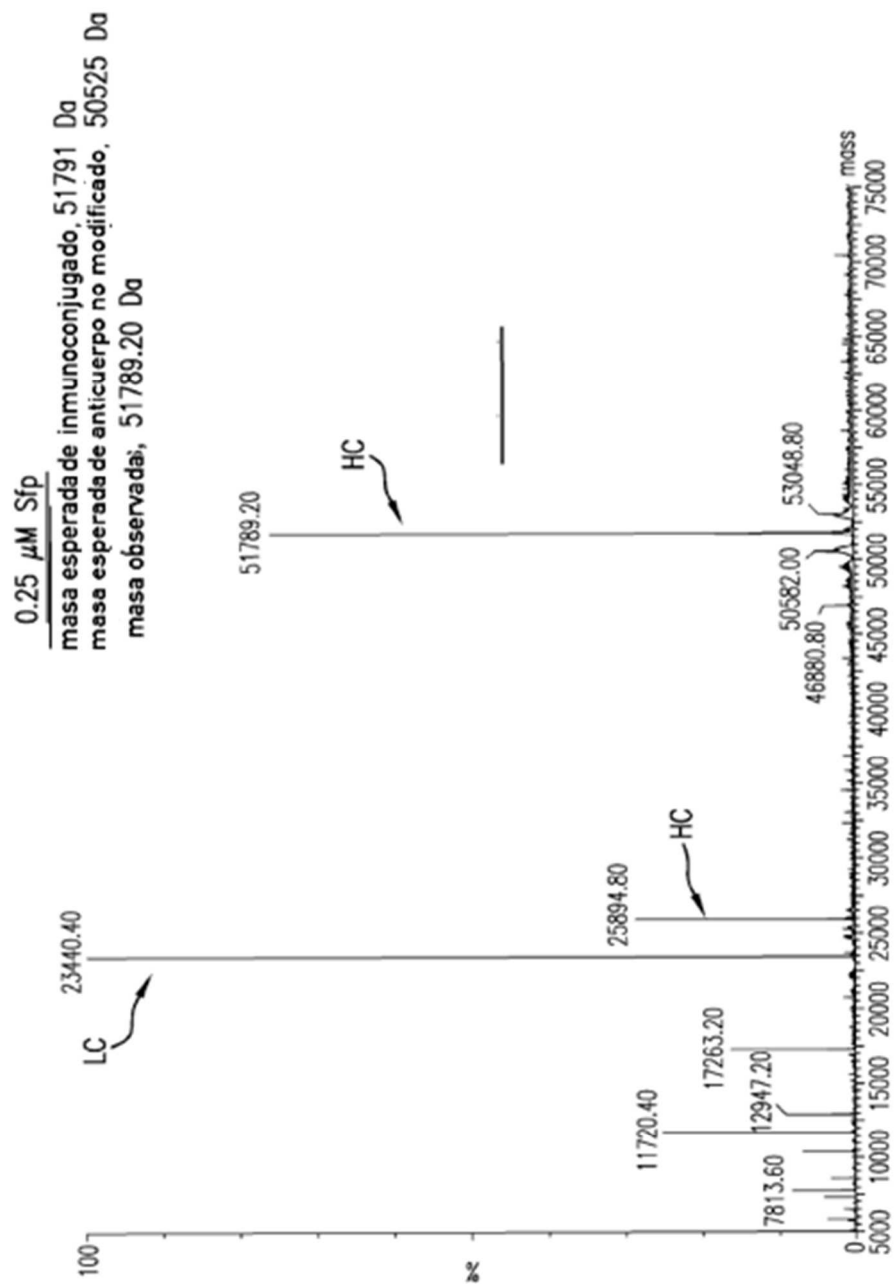
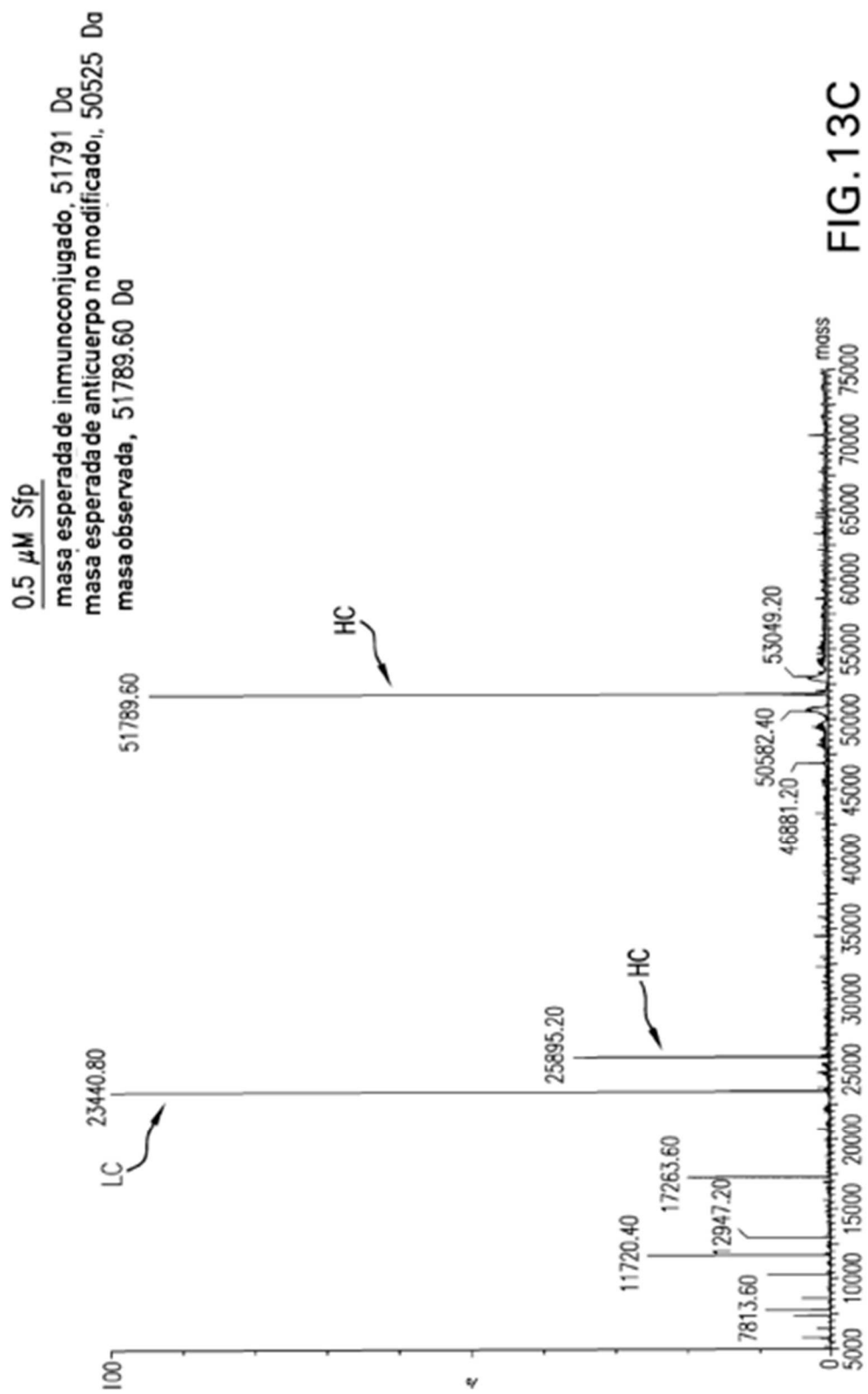


FIG.13B



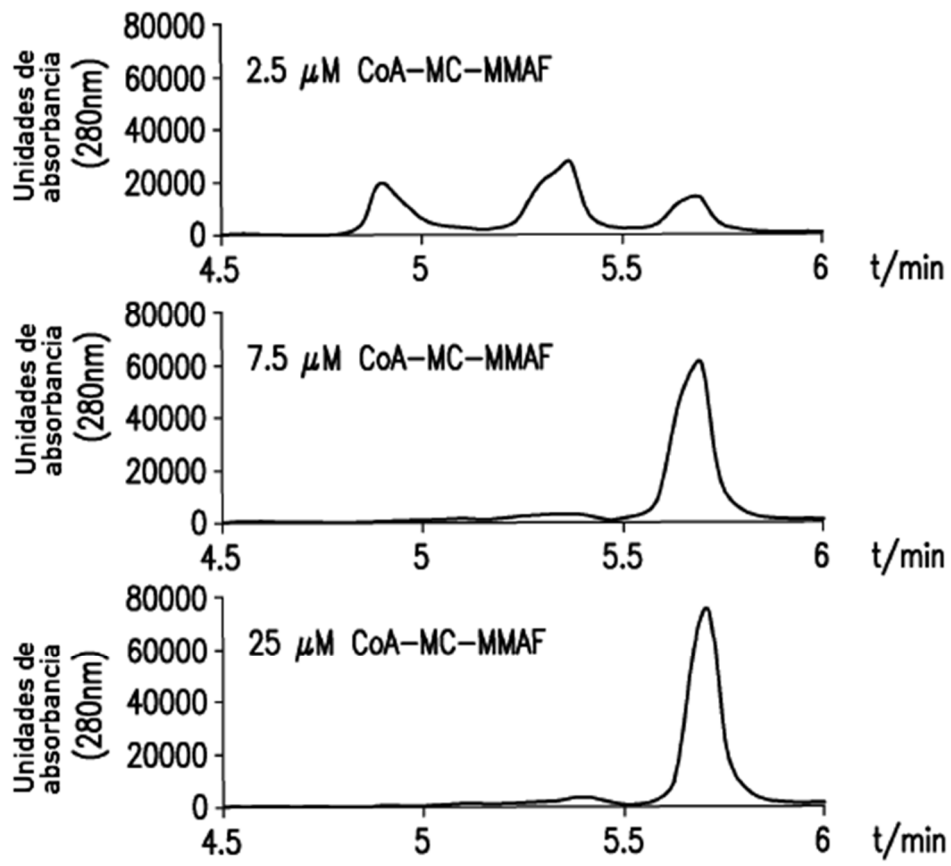


FIG.14A

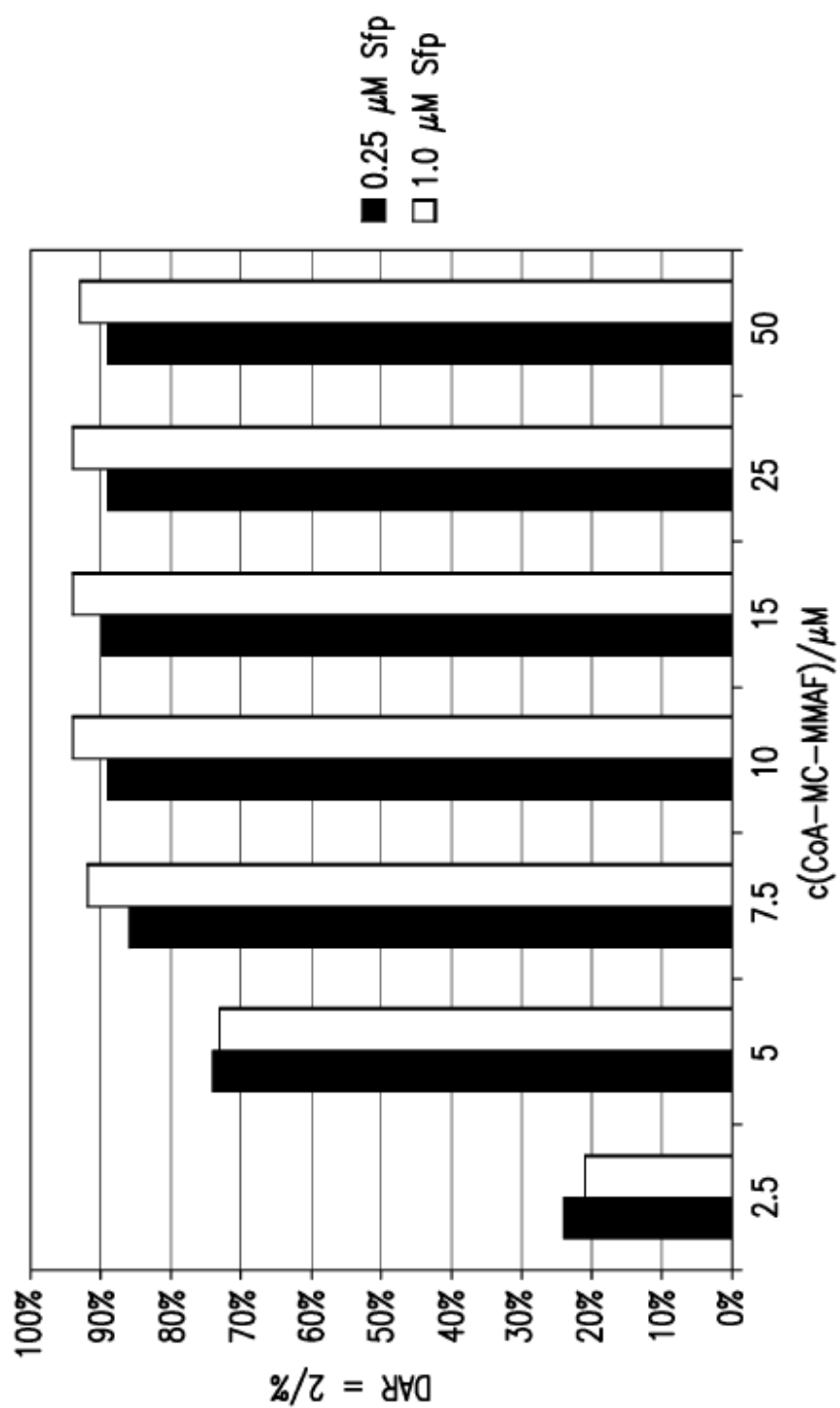


FIG.14B

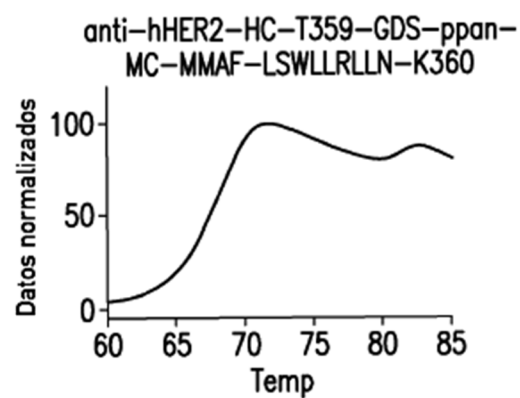


FIG.15A

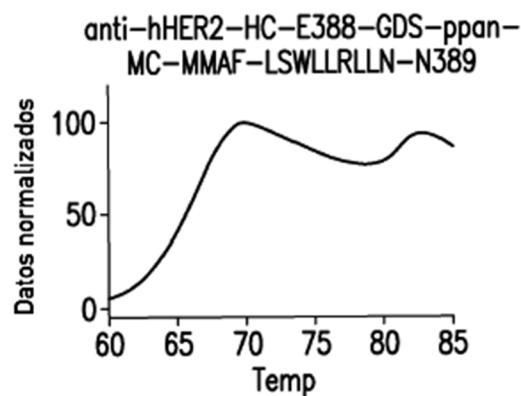


FIG.15B

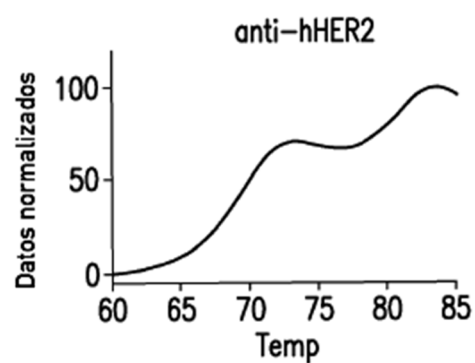


FIG.15C

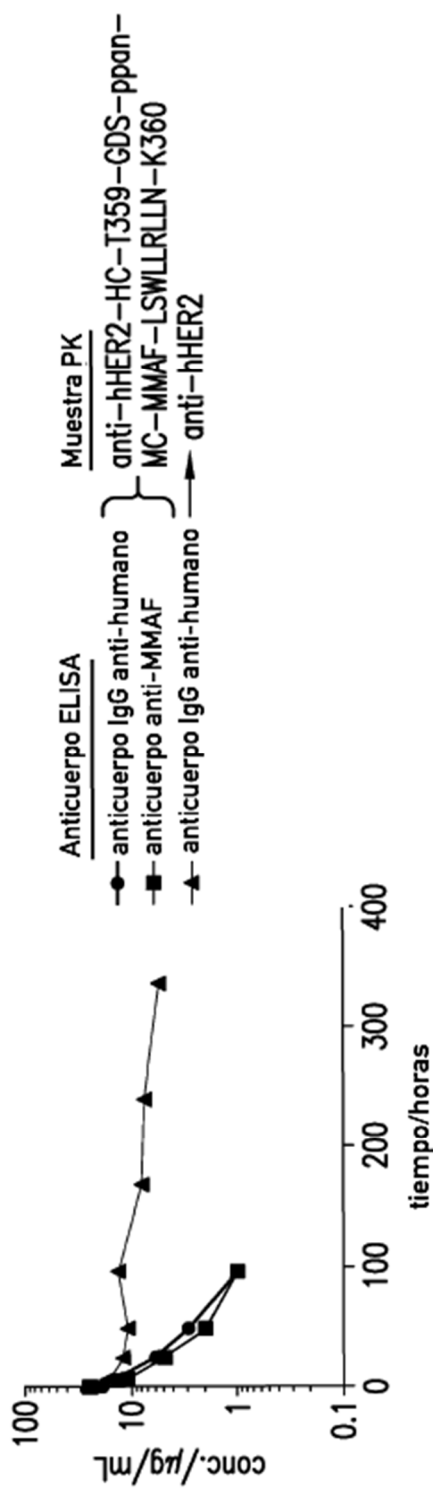


FIG. 16A

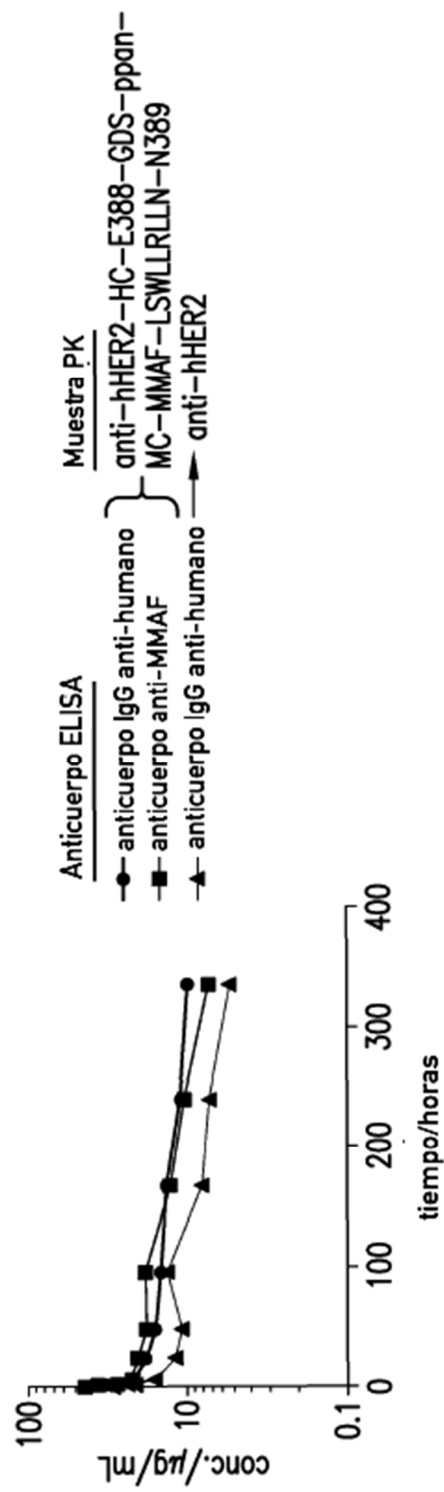


FIG. 16B

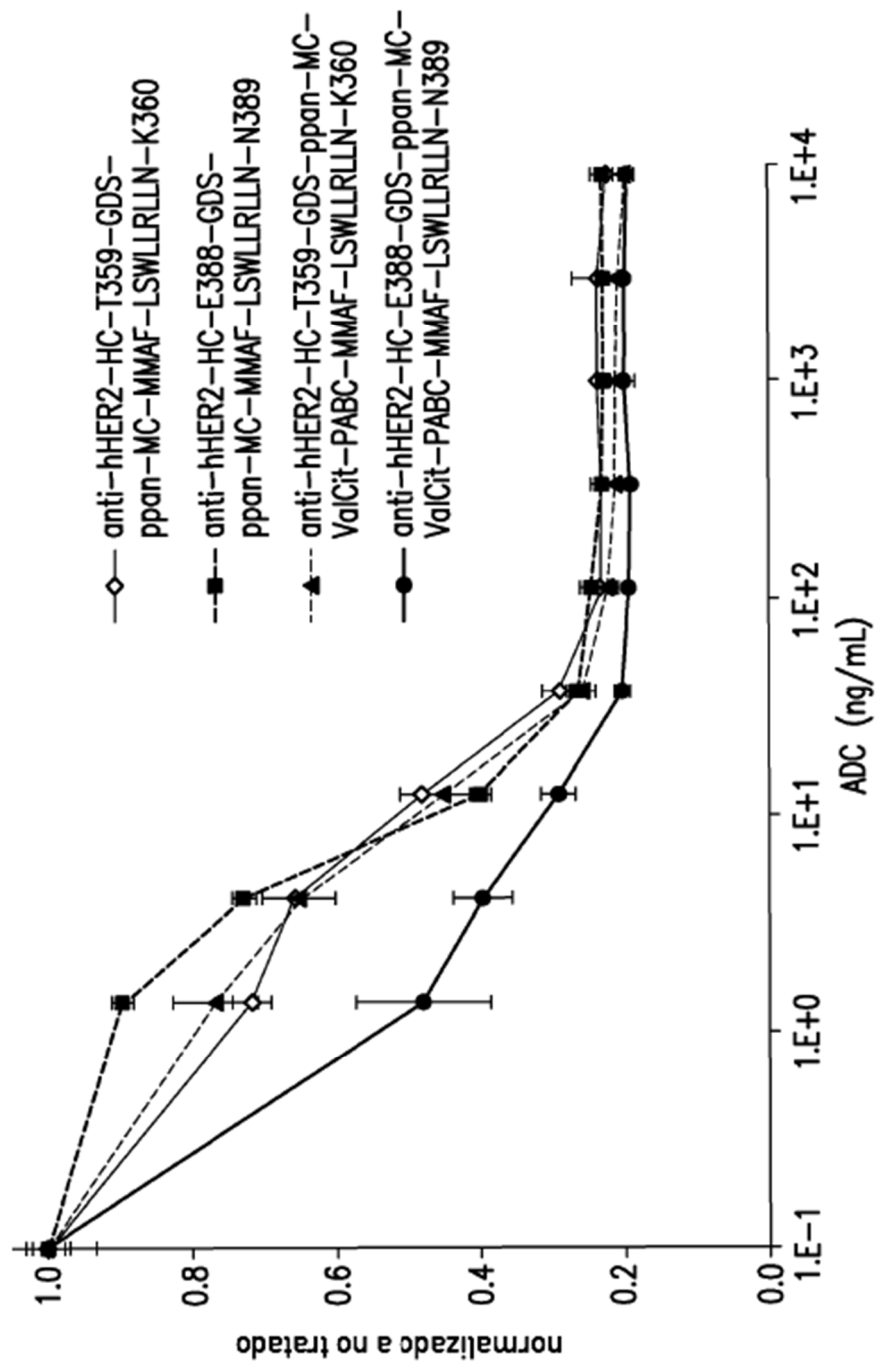


FIG.17

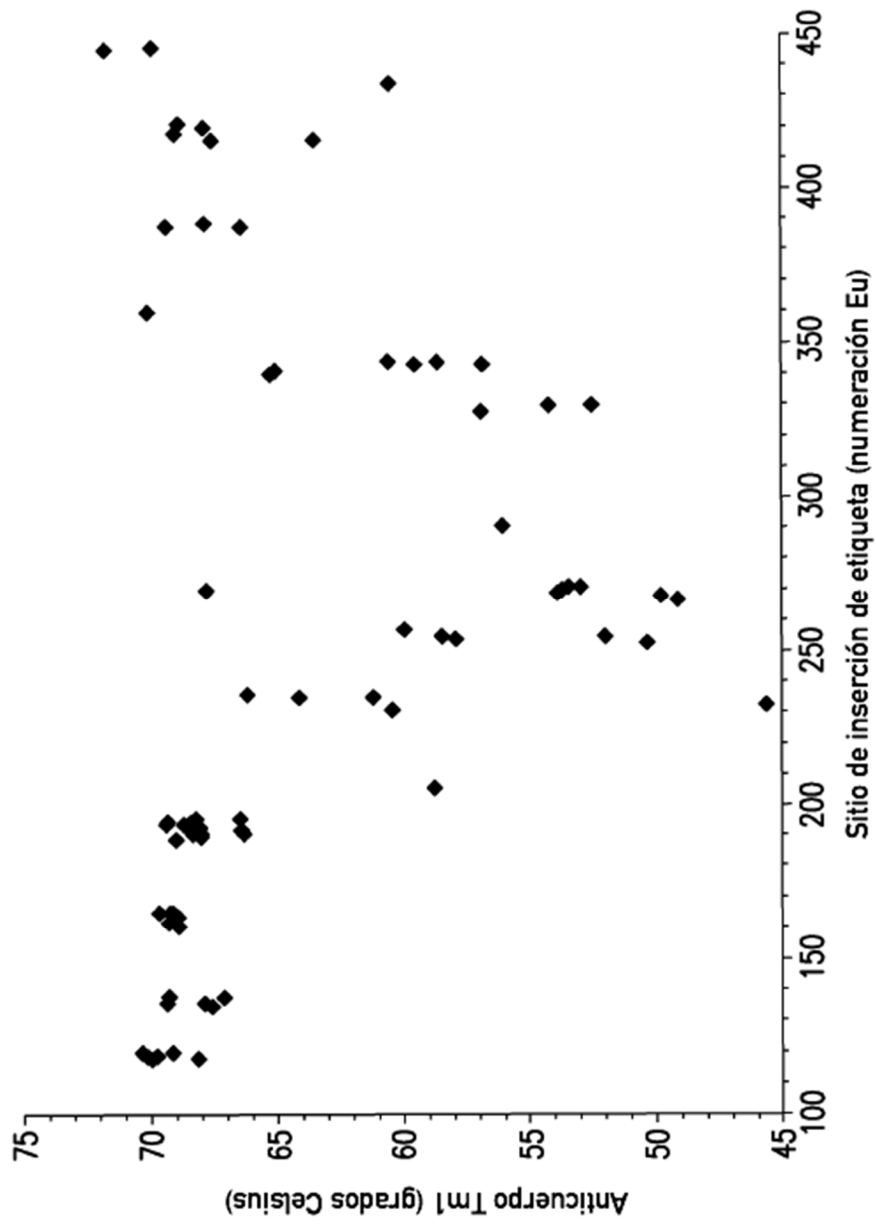


FIG.18

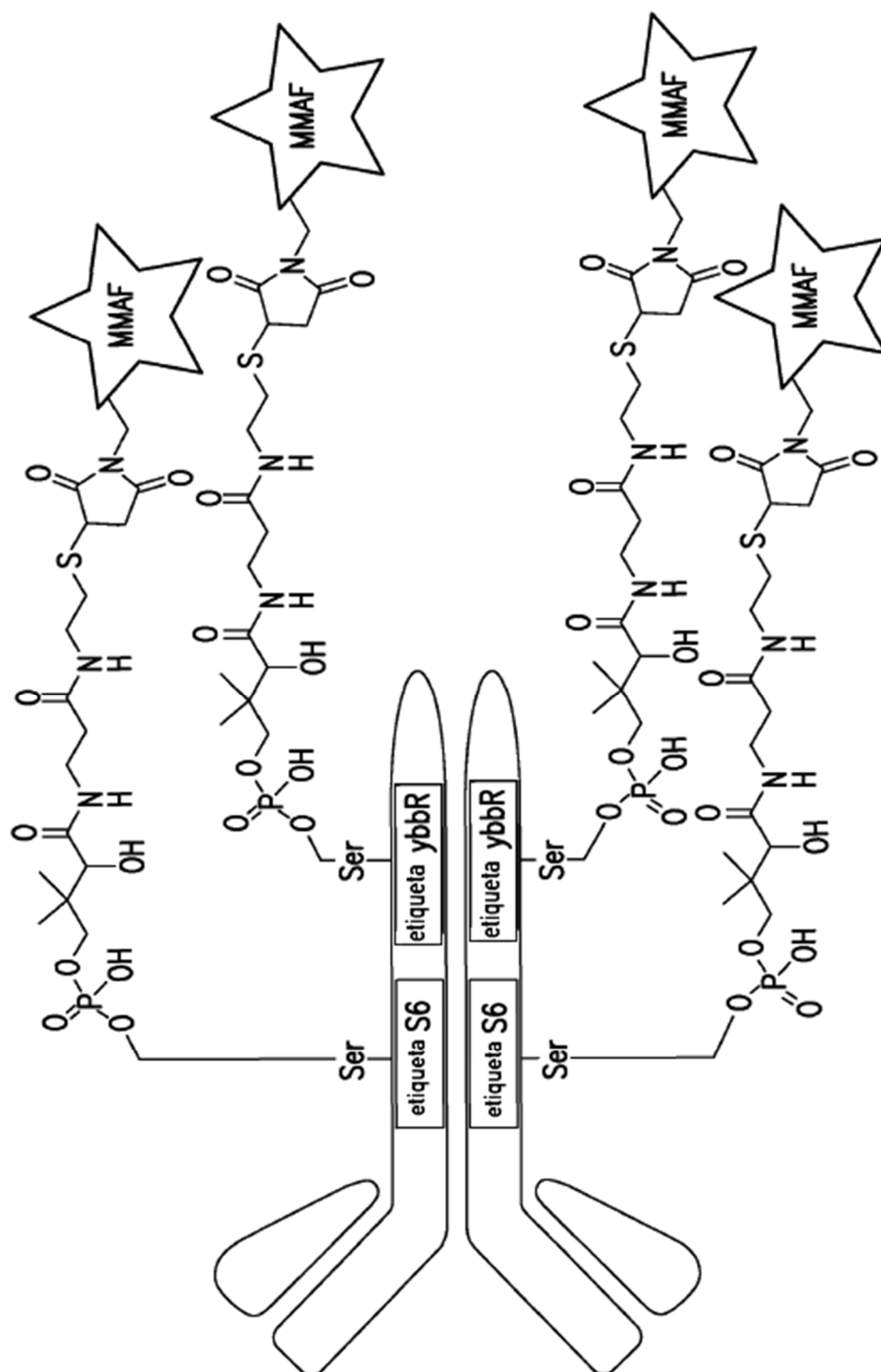


FIG. 19A

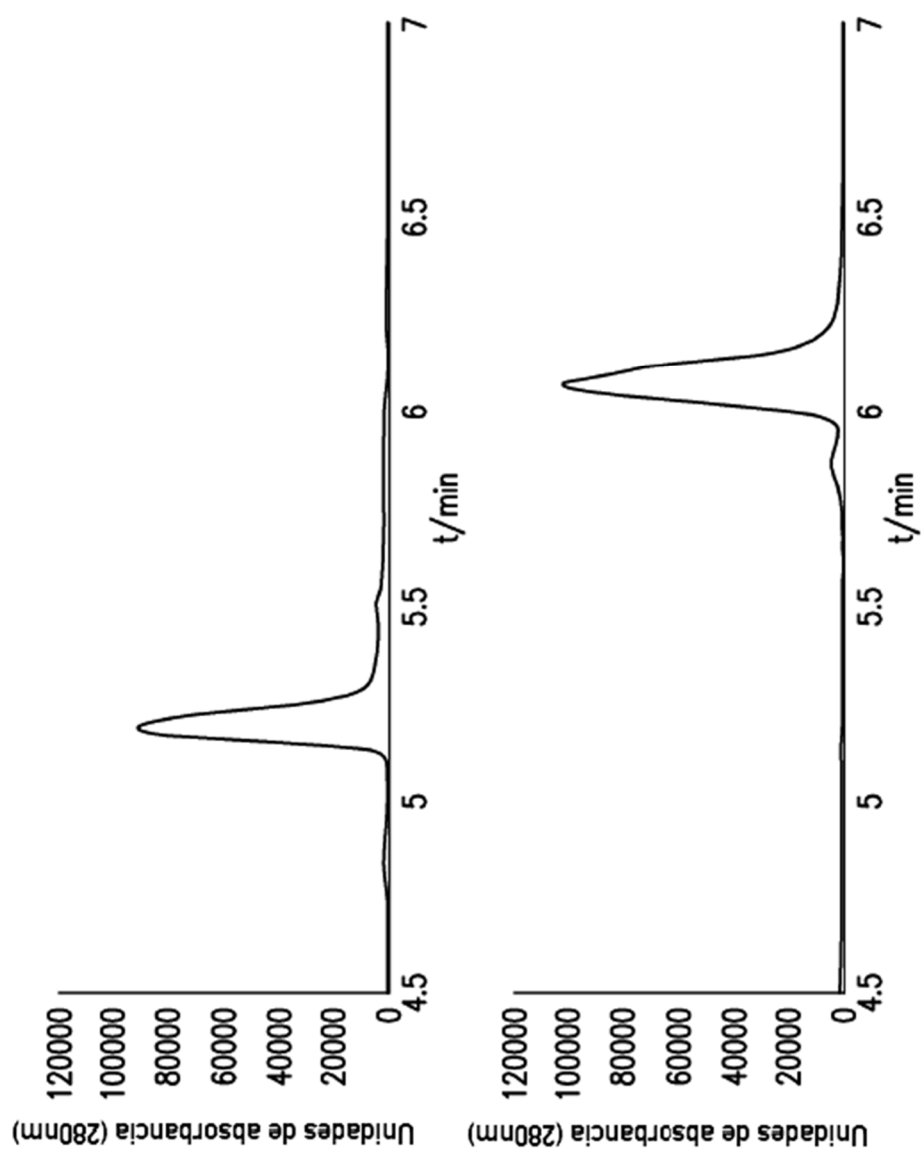


FIG.19B

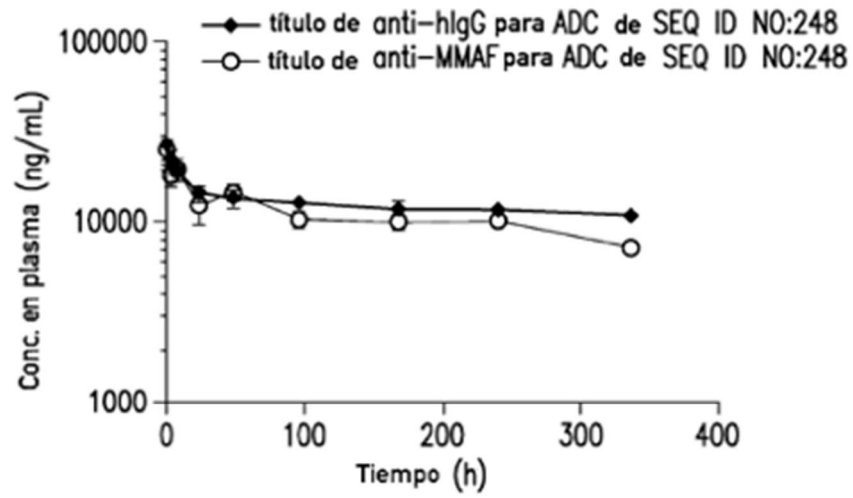


FIG.20A

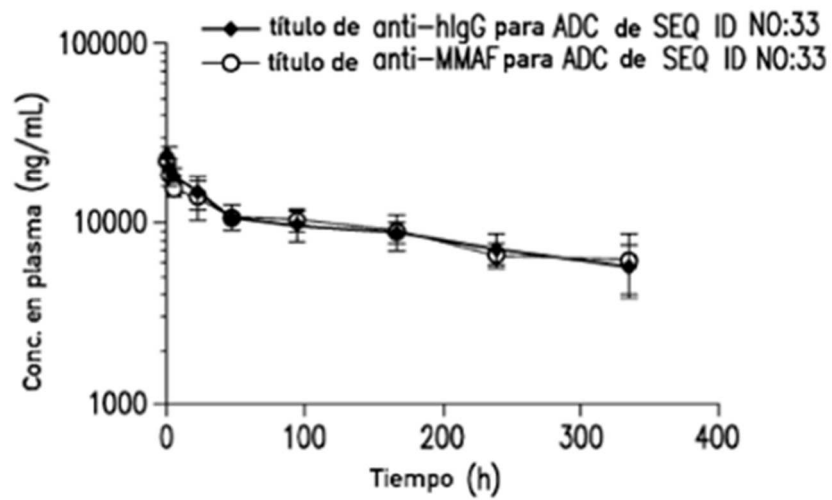


FIG.20B

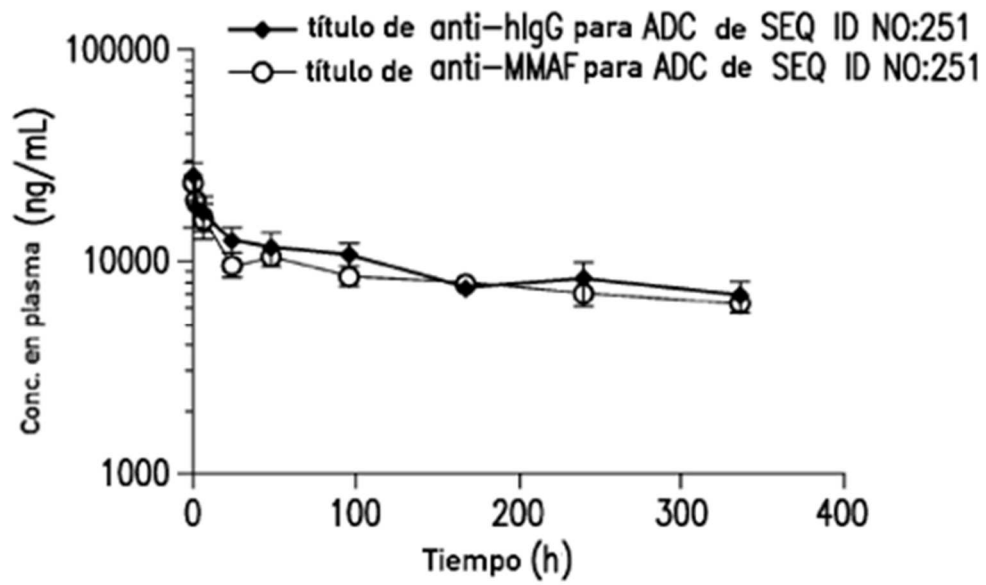


FIG. 20C

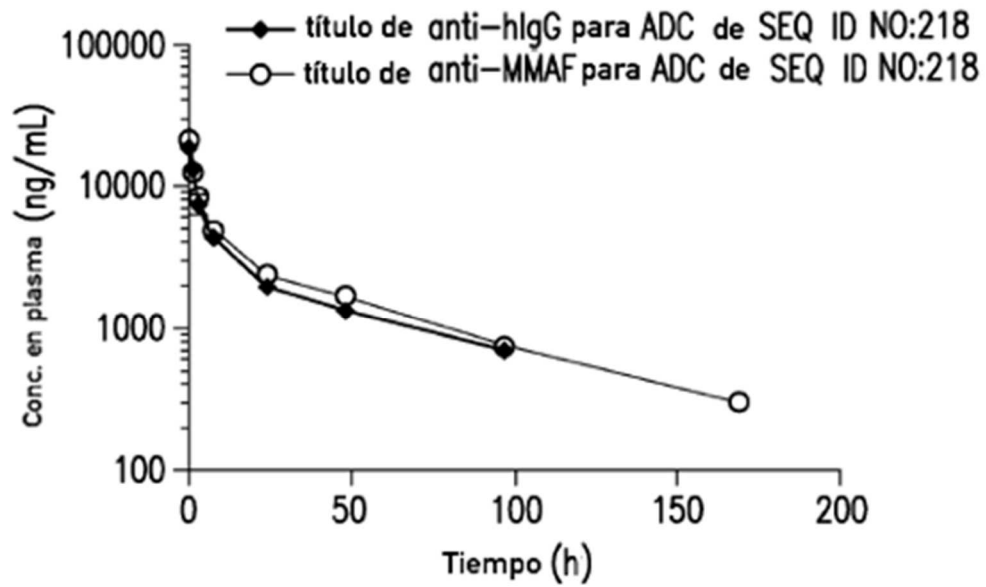


FIG. 20D

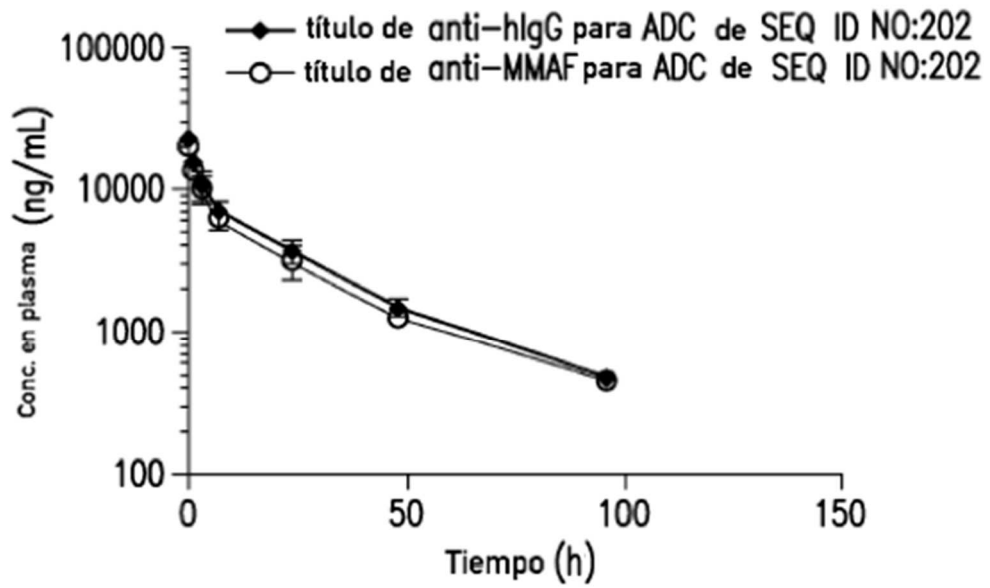


FIG.20E

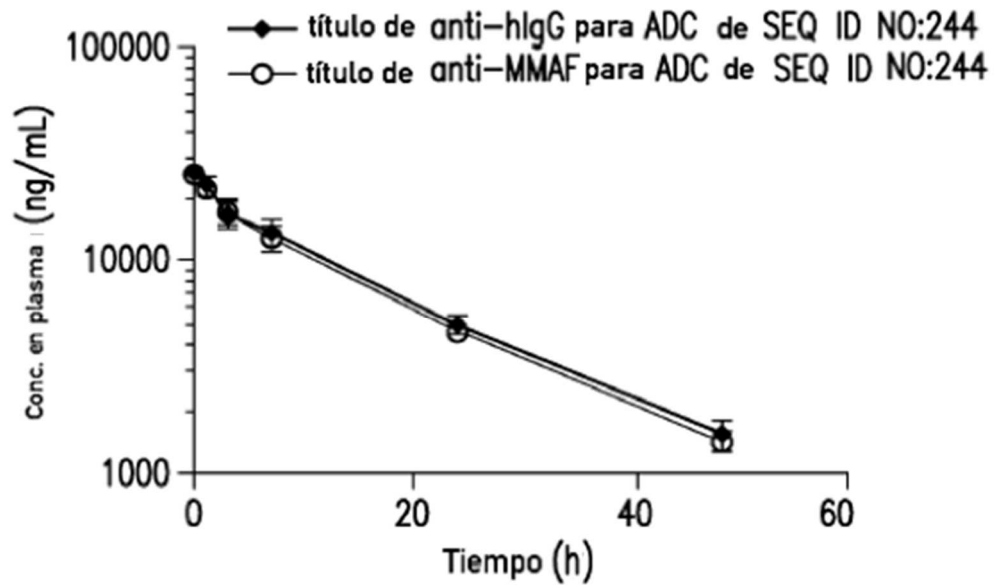


FIG.20F

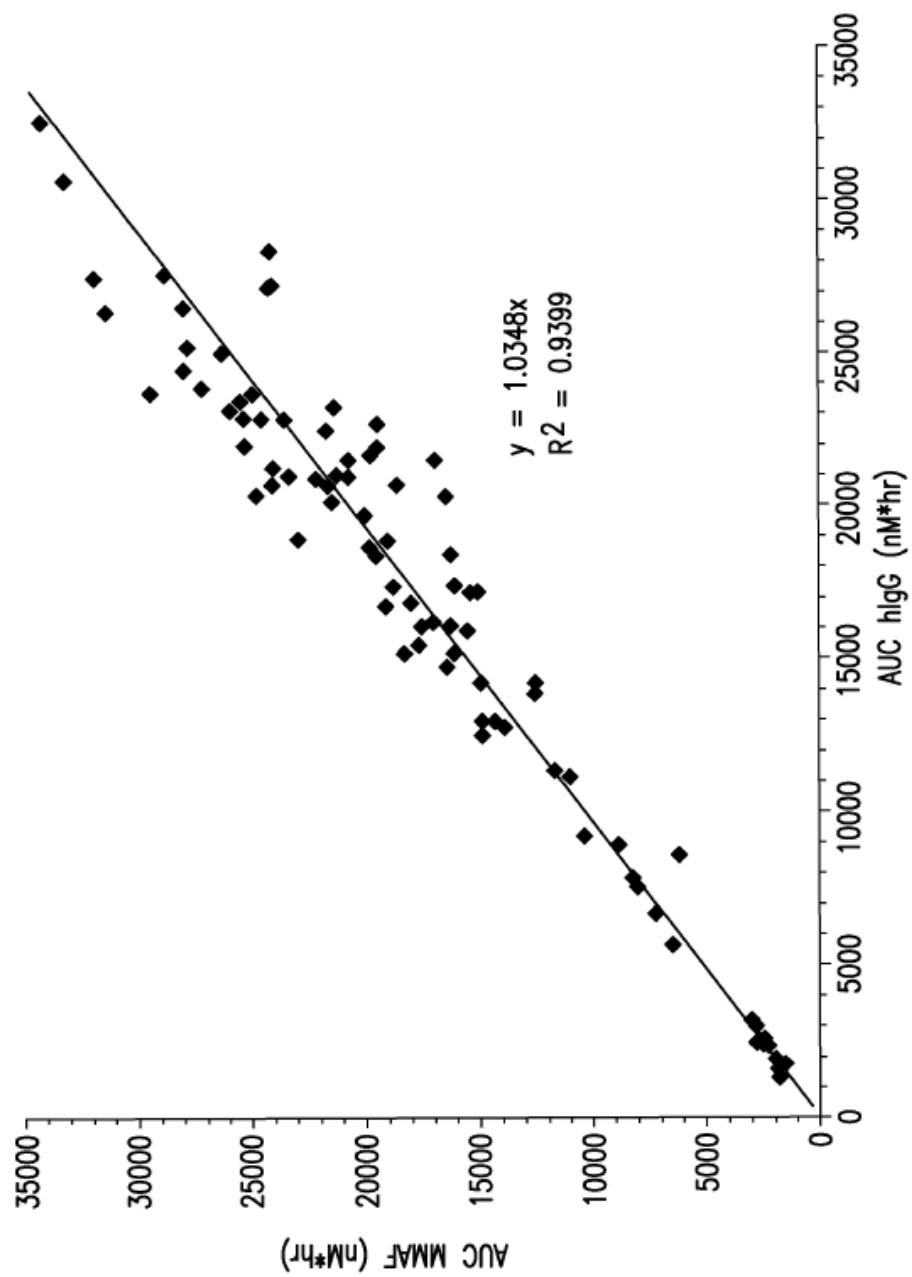
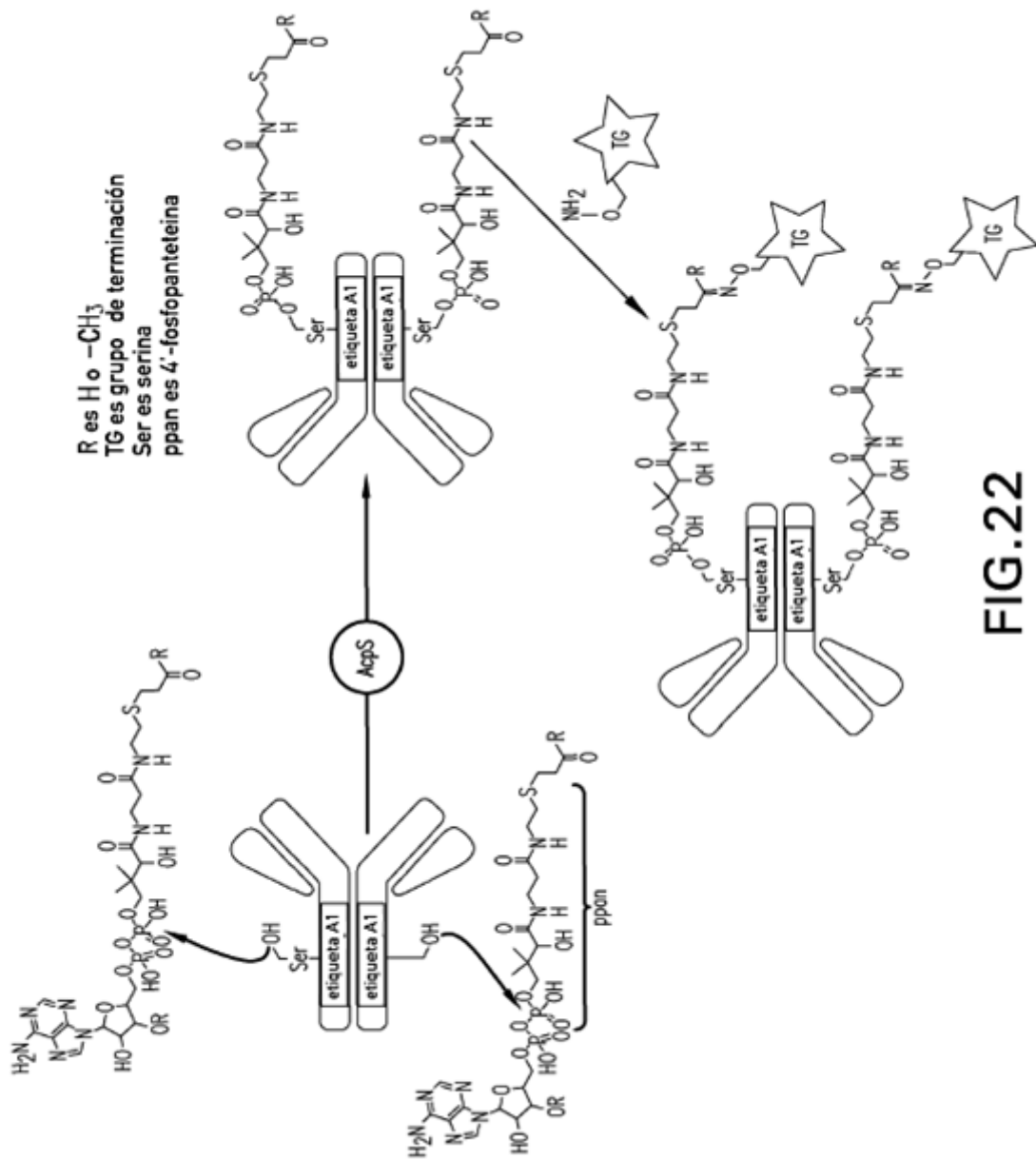


FIG.21



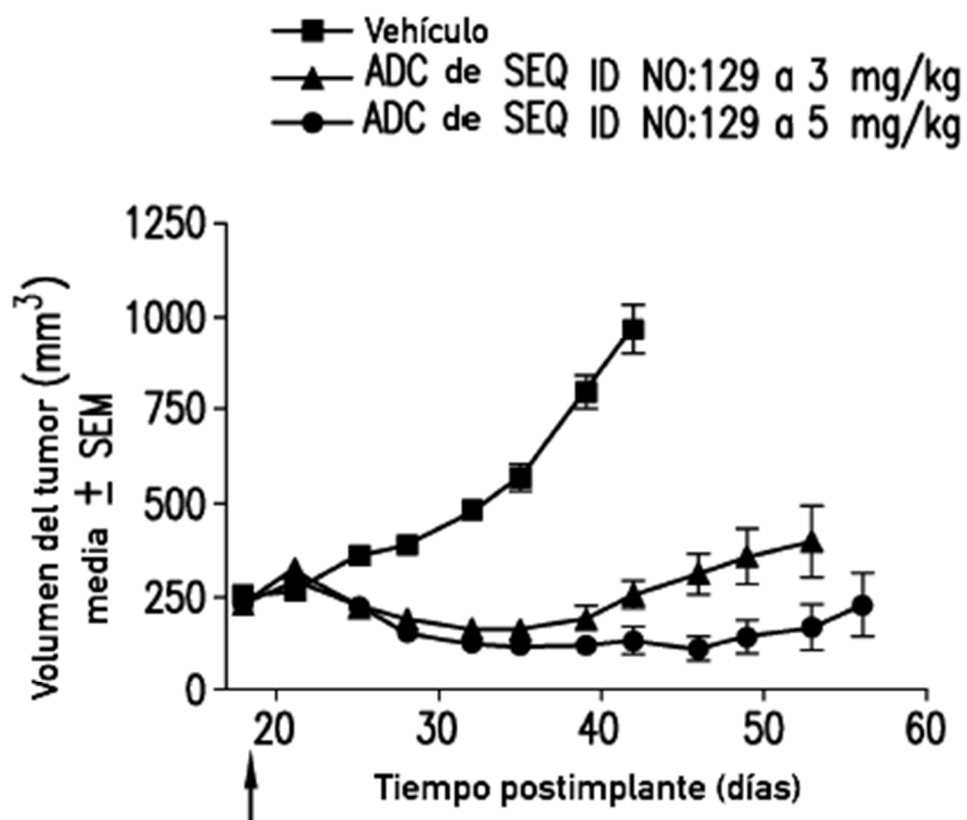


FIG.23