

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar una inmunoglobulina conjugada, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende:

poner una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, en contacto con una transglutaminasa microbiana y un agente funcional que comprende un sustrato donante de acilo,

a) en donde la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende un residuo lisina modificado, en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina,

b) en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina y

c) en donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico,

en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo sobre el agente funcional, generando de esa manera la inmunoglobulina conjugada.

2. Un método para generar una inmunoglobulina conjugada, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende:

i) poner una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, en contacto con una transglutaminasa microbiana y un sustrato donante de acilo,

a) en donde la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende un residuo lisina modificado, en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y

b) en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina y

un grupo reactivo,

en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo, y

ii) conjugar un agente funcional con el grupo reactivo del sustrato donante de acilo, en donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, para así generar la inmunoglobulina conjugada.

3. El método de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el grupo reactivo del sustrato donante de acilo se conjuga con el agente funcional mediante una química click.

4. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina se selecciona del grupo que consiste en:

Treonina 135 (T135K), Serina 136 (S136K), Leucina 193 (L193K), Ácido aspártico 221 (D221K), Treonina 223 (T223K), Histidina 224 (H224K), Treonina 225 (T225K), Metionina 252 (M252K), Asparagina 297 (N297K) o Prolina 445 (P445K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma,

Leucina 201 (L201K) o Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, o

Ácido glutámico 213 (E213K) sobre una cadena liviana lambda de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

5. El método de la reivindicación 4, CARACTERIZADO PORQUE la cadena pesada comprende además un residuo de aminoácido que se ha agregado por su extremo C-terminal en la posición 448, y en donde dicho residuo de aminoácido no es prolina o un residuo de aminoácido ácido.

6. El método de la reivindicación 5, CARACTERIZADO PORQUE el

residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal en la posición 448 es leucina.

7. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la inserción del residuo lisina es un residuo lisina que se ha insertado entre la Serina 191 y la Serina 192 o entre la Serina 192 y la Leucina 193 sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

8. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es un fragmento de unión al antígeno (Fab), y en donde el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina se selecciona del grupo que consiste en: Ácido aspártico 221 (D221K), Treonina 223 (T223K), Histidina 224 (H224K), Treonina 225 (T225K), Prolina 228 (P228K), Prolina 230 (P230K) y Ácido glutámico 233 (E233K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

9. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE el Fab comprende toda la región bisagra.

10. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE el Fab comprende una región bisagra truncada.

11. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende además un segundo residuo lisina modificado, en donde el segundo residuo lisina modificado es un segundo residuo lisina insertado o un segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un segundo residuo lisina, y en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el segundo residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo.

12. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

13. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Treonina 135 (T135K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Leucina 201 (L201K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

14. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Treonina 135 (T135K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

15. El método de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE la cadena pesada comprende además un residuo de aminoácido que se ha agregado por su extremo C-terminal en la posición 448, y en donde dicho residuo de aminoácido no es prolina o un residuo de aminoácido ácido.

16. El método de la reivindicación 15, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal en la posición 448

es leucina.

17. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende además un tercer residuo lisina modificado, en donde el tercer residuo lisina modificado es un tercer residuo lisina insertado o un tercer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un tercer residuo lisina, y en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el tercer residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo.

18. El método de la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Asparagina 297 (N297K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el tercer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el tercer residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

19. El método de la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende además un cuarto residuo lisina modificado, en donde el cuarto residuo lisina modificado es un cuarto residuo lisina insertado o un cuarto residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el cuarto residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo.

20. El método de la reivindicación 19, CARACTERIZADO PORQUE el

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

21. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido después del residuo lisina modificado no es prolina o un residuo de aminoácido ácido.

22. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido antes del residuo lisina modificado no es un residuo de aminoácido ácido.

23. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido antes del residuo lisina modificado es

un residuo de aminoácido no ácido insertado, o

un residuo de aminoácido ácido natural que se ha mutado en un residuo de aminoácido no ácido.

24. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido después del residuo lisina modificado es

un residuo de aminoácido insertado, en donde el residuo de aminoácido

insertado es un residuo de aminoácido insertado no ácido y un residuo insertado que no es prolina, o

un residuo de aminoácido ácido natural o un residuo prolina natural, que se ha mutado en un residuo de aminoácido no ácido y un residuo que no es prolina.

25. El método de la reivindicación 23, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido no ácido es lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano.

26. El método de la reivindicación 23 o la reivindicación 24, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido no ácido insertado comprende la inserción de una lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano.

27. El método de la reivindicación 24, CARACTERIZADO PORQUE el aminoácido no ácido y el residuo que no es prolina es lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano.

28. El método de la reivindicación 23 o la reivindicación 24, CARACTERIZADO PORQUE el residuo de aminoácido ácido natural es ácido aspártico o ácido glutámico.

29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende una cadena pesada que comprende además por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado por su extremo C-terminal en la posición 448, y en donde dicho por lo menos un residuo de aminoácido no es prolina o un residuo de aminoácido ácido.

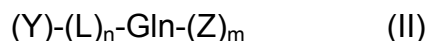
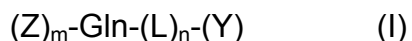
30. El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE dicho

por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal en la posición 448 es leucina.

31. El método de la reivindicación uno o la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende una cadena liviana que comprende una inserción de uno a cuatro aminoácidos adicionales después de la cisteína 214, en donde el residuo lisina insertado es un residuo lisina que se ha insertado después de uno a cuatro aminoácidos adicionales, y en donde se ha insertado un residuo leucina después del residuo lisina.

32. El método de la reivindicación 31, CARACTERIZADO PORQUE la inserción de uno a cuatro aminoácidos adicionales después de la cisteína 214, el residuo lisina que se ha insertado después de uno a cuatro aminoácidos adicionales y el residuo leucina que se ha insertado después del residuo lisina, comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: GKL, GGKL, GGSKL y GGSGKL.

33. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la Fórmula (I) o (II):



en donde

Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido;

Gln es un residuo de aminoácido glutamina;

cada L es de manera independiente un conector de cadena lineal o ramificada de entre 1 y 20 átomos de carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono se puede reemplazar de manera opcional e independiente con un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y de nitrógeno

se puede sustituir opcionalmente; o cada L es de manera opcional e independiente un residuo de aminoácido;

m es un número entero de entre 0 y 5;

n es un número entero de entre 0 y 5; y

Y es un agente funcional.

34. El método de la reivindicación 33, CARACTERIZADO PORQUE el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde cada L es de manera independiente una unidad de polietilenglicol (PEG) (-O((CH₂)₂)-), etilamina (-NH((CH₂)₂)-) o propilamina (-NH((CH₂)₃)-); y en donde n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

35. El método de la reivindicación 33, CARACTERIZADO PORQUE el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), en donde Z es un grupo CBZ y L es un aminoácido.

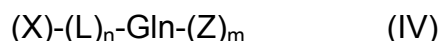
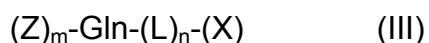
36. El método de la reivindicación 35, CARACTERIZADO PORQUE L es Gly; m es 1; y n es 0.

37. El método de la reivindicación 35, CARACTERIZADO PORQUE L es Gly; m es 1; y n es 1.

38. El método de la reivindicación 33, CARACTERIZADO PORQUE el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (II), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un L es Gly.

39. El método de la reivindicación 33, CARACTERIZADO PORQUE el agente funcional Y es auristatina F.

40. El método de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la Fórmula (III) o (IV):



en donde

Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido;

Gln es un residuo de aminoácido glutamina;

cada L es de manera independiente un conector de cadena lineal o ramificada de entre 1 y 20 átomos de carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono se puede reemplazar de manera opcional e independiente por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y de nitrógeno puede estar sustituido opcionalmente; o cada L es de manera opcional e independiente un residuo de aminoácido;

m es un número entero de entre 0 y 5;

n es un número entero de entre 0 y 5; y

X es un grupo reactivo.

41. El método de la reivindicación 40, CARACTERIZADO PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde cada L es de manera independiente una unidad de polietilenglicol (PEG) (-O((CH₂)₂)-), etilamina (-NH((CH₂)₂)-) o propilamina (-NH((CH₂)₃)-); y en donde n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

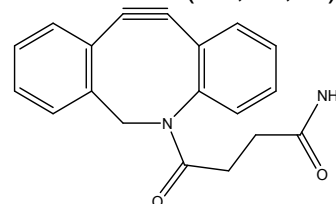
42. El método de la reivindicación 40, CARACTERIZADO PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), en donde Z es un grupo CBZ y en donde uno o más L es un aminoácido.

43. El método de la reivindicación 42, CARACTERIZADO PORQUE L es Gly; m es 1; y n es 1.

44. El método de la reivindicación 42, CARACTERIZADO PORQUE m es 1; y n es 0.

45. El método de la reivindicación 40, CARACTERIZADO PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (IV), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un L es Gly.

46. El método de la reivindicación 40, CARACTERIZADO PORQUE X es un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en (1R,8S,9s)-



biciclo[6,1,0]non-4-en-9-ilmetanol (BCN),

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

47. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el agente terapéutico es un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo, un agente quimioterapéutico, un agente farmacéutico, un agente radioactivo, un agente citotóxico, un antibiótico, una molécula pequeña, un ácido nucleico o un polipéptido.

48. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el agente de diagnóstico es un fluoróforo, un colorante fluorescente, un radionúclido o una enzima.

49. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la transglutaminasa microbiana es una transglutaminasa microbiana de *Streptomyces mobaraensis*.

50. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgG₁, o una porción de unión al antígeno de la misma.

51. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgG₂, IgG₃ o IgG₄, o una porción de unión al antígeno de la misma.

52. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgA₁, una IgA₂ o una IgM, o una porción de unión al antígeno de la misma.

53. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgD o IgE, o una porción de unión al antígeno de la misma.

54. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es un fragmento de unión al antígeno (Fab).

55. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina humana, o una porción de unión al antígeno de la misma, o una inmunoglobulina humanizada, o una porción de unión al antígeno de la misma.

56. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina quimérica, o una porción de unión al antígeno de la misma, o una inmunoglobulina no humana, o una porción de unión al antígeno de la misma.

57. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas.

58. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADO PORQUE la relación entre el agente funcional y la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es de entre 1:1 y

100:1 o entre 1:1 y 200:1.

59. Una inmunoglobulina conjugada, CARACTERIZADA PORQUE comprende una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la mismas, y un agente funcional, en donde

a) la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende un residuo lisina modificado, en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina,

b) el agente funcional comprende un sustrato donante de acilo, en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina, y

c) el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, en donde el residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, está conjugado con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo del agente funcional.

60. Una inmunoglobulina conjugada, CARACTERIZADA PORQUE comprende una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y un agente funcional, en donde

a) la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende un residuo lisina modificado, en donde el residuo lisina modificado es un residuo lisina insertado o un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina,

b) la lisina C-terminal se conjuga con un residuo glutamina en un sustrato donante de acilo, en donde el sustrato donante de acilo además comprende un grupo reactivo,

c) el grupo reactivo se conjuga con un agente funcional, en donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.

61. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la

reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina se selecciona del grupo que consiste en:

Treonina 135 (T135K), Serina 136 (S136K), Leucina 193 (L193K), Ácido aspártico 221 (D221K), Treonina 223 (T223K), Histidina 224 (H224K), Treonina 225 (T225K), Metionina 252 (M252K), Asparagina 297 (N297K) o Prolina 445 (P445K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma,

Leucina 201 (L201K) o Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, o

Ácido glutámico 213 (E213K) sobre una cadena liviana lambda de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

62. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 61, CARACTERIZADA PORQUE la cadena pesada comprende además un residuo de aminoácido que se ha agregado por su extremo C-terminal en la posición 448, y en donde dicho residuo de aminoácido no es prolina o un residuo de aminoácido ácido.

63. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 62, CARACTERIZADA PORQUE dicho por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal en la posición 448 es leucina.

64. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE la inserción del residuo lisina es un residuo lisina que se ha insertado entre la Serina 191 y la Serina 192 o entre la Serina 192 y la Leucina 193 sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

65. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es un fragmento de unión al antígeno (Fab), y en donde el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina se

selecciona del grupo que consiste en: Ácido aspártico 221 (D221K), Treonina 223 (T223K), Histidina 224 (H224K), Treonina 225 (T225K), Prolina 228 (P228K), Prolina 230 (P230K) y Ácido glutámico 233 (E233K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

66. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 65, CARACTERIZADA PORQUE el Fab comprende toda la región bisagra.

67. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 65, CARACTERIZADA PORQUE el Fab comprende una región bisagra truncada.

68. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende además un segundo residuo lisina modificado, en donde el segundo residuo lisina modificado es un segundo residuo lisina insertado o un segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y en donde el segundo residuo lisina modificado está conjugado con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo.

69. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 68, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

70. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 68, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Treonina 135 (T135K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina

modificado es Leucina 201 (L201K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

71. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 68, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Treonina 135 (T135K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

72. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 70 o la reivindicación 71, CARACTERIZADA PORQUE la cadena pesada comprende además por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado por su extremo C-terminal en la posición 448, y en donde dicho por lo menos un residuo de aminoácido no es prolina o un residuo de aminoácido ácido.

73. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 72, CARACTERIZADA PORQUE dicho por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal en la posición 448 es leucina.

74. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 69, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende además un tercer residuo lisina modificado, en donde el tercer residuo lisina modificado es un tercer residuo lisina insertado o un tercer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y en donde el tercer residuo lisina modificado está conjugado con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo.

75. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 74, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de

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

76. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 74, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende además un cuarto residuo lisina modificado, en donde el cuarto residuo lisina modificado es un cuarto residuo lisina insertado o un cuarto residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y en donde el cuarto residuo lisina modificado está conjugado con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo.

77. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 76, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Asparagina 297 (N297K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, el tercer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el tercer residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, y el cuarto residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el cuarto residuo lisina modificado es Prolina 445 (P445K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma.

78. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido después del residuo lisina modificado no es un residuo prolina o un residuo de aminoácido ácido.

79. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido antes del residuo lisina modificado no es un residuo de aminoácido ácido.

80. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido antes del residuo lisina modificado es

un residuo de aminoácido no ácido insertado, o

un residuo de aminoácido ácido natural que se ha mutado en un residuo de aminoácido no ácido.

81. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido después del residuo lisina modificado es

un residuo de aminoácido insertado, en donde el residuo de aminoácido insertado es un residuo de aminoácido no ácido y un residuo insertado que no es prolina, o

un residuo de aminoácido ácido natural o un residuo prolina natural, que se ha mutado en un residuo de aminoácido no ácido y un residuo que no es prolina.

82. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 80, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido no ácido es lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano.

83. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 80, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido no ácido insertado es una

inserción de un residuo lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano.

84. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 81, CARACTERIZADA PORQUE el aminoácido no ácido y residuo que no es prolina es lisina, arginina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptofano.

85. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 80 o la reivindicación 81, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido ácido natural es ácido aspártico o ácido glutámico.

86. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende una cadena pesada que comprende además por lo menos un residuo de aminoácido que se ha agregado por su extremo C-terminal en la posición 448, y en donde dicho por lo menos un residuo de aminoácido no es prolina o un residuo de aminoácido ácido.

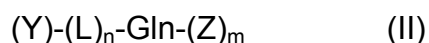
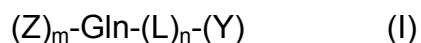
87. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 86, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido que se ha agregado al extremo C-terminal en la posición 448 es leucina.

88. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende una cadena liviana que comprende una inserción de uno a cuatro aminoácidos adicionales después de la cisteína 214, en donde la inserción del residuo lisina es un residuo lisina que se ha insertado después de dichos uno a cuatro aminoácidos adicionales, y en donde se ha insertado un residuo leucina después del residuo lisina.

89. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 88,

CARACTERIZADA PORQUE la inserción de uno a cuatro aminoácidos adicionales después de la cisteína 214, el residuo lisina que se ha insertado después de dichos uno a cuatro aminoácidos adicionales y el residuo leucina que se ha insertado después del residuo lisina comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: GKL, GGKL, GGSKL y GGSGKL.

90. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59, CARACTERIZADA PORQUE el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la Fórmula (I) o (II):



en donde

Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido;

Gln es un residuo de aminoácido glutamina;

cada L es de manera independiente un conector de cadena lineal o ramificada de entre 1 y 20 átomos de carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono se puede reemplazar de manera opcional e independiente por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y de nitrógeno se puede sustituir opcionalmente; o cada L es de manera opcional e independiente un residuo de aminoácido;

m es un número entero de entre 0 y 5;

n es un número entero de entre 0 y 5; y

Y es un agente funcional.

91. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 90, CARACTERIZADA PORQUE el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde cada L es de manera independiente una unidad de polietilenglicol (PEG) (-O((CH₂)₂)-), etilamina (-NH((CH₂)₂)-) o propilamina (-NH((CH₂)₃)-); y en donde n es

0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

92. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 90, CARACTERIZADA PORQUE el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), en donde Z es un grupo CBZ y en donde L es un aminoácido.

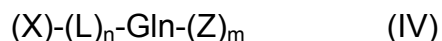
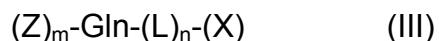
93. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 92, CARACTERIZADA PORQUE L es Gly; m es 1; y n es 0.

94. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 92, CARACTERIZADA PORQUE L es Gly; m es 1; y n es 1.

95. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 90, CARACTERIZADA PORQUE el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (II), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un L es Gly.

96. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 90, CARACTERIZADA PORQUE el agente funcional Y es auristatina F.

97. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la Fórmula (III) o (IV):



en donde

Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido;

Gln es un residuo de aminoácido glutamina;

cada L es de manera independiente un conector de cadena lineal o ramificada de entre 1 y 20 átomos de carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono se puede reemplazar de manera opcional e independiente por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y de nitrógeno

se puede sustituir opcionalmente; o cada L es de manera opcional e independiente un residuo de aminoácido;

m es un número entero de entre 0 y 5;

n es un número entero de entre 0 y 5; y

X es un grupo reactivo.

98. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 97, CARACTERIZADA PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde cada L es de manera independiente una unidad de polietilenglicol (PEG) (-O((CH₂)₂)-), etilamina (-NH((CH₂)₂)-) o propilamina (-NH((CH₂)₃)-); y en donde n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

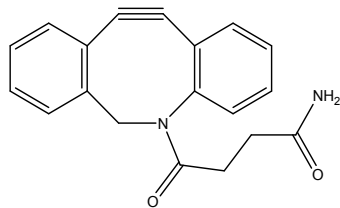
99. El método de la reivindicación 97, CARACTERIZADO PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), en donde Z es un grupo CBZ y en donde uno o más L es un aminoácido.

100. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 99, CARACTERIZADA PORQUE L es Gly; m es 1; y n es 1.

101. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 99, CARACTERIZADA PORQUE m es 1; y n es 0.

102. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 97, CARACTERIZADA PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (IV), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un L es Gly.

103. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 97, CARACTERIZADA PORQUE X es un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en (1R,8S,9s)-biciclo[6,1,0]non-4-en-9-ilmetanol (BCN),



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

104. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE el agente terapéutico es un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo, un agente quimioterapéutico, un agente farmacéutico, un agente radioactivo, un agente citotóxico, un antibiótico, una molécula pequeña, ácido nucleico o un polipéptido.

105. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE el agente de diagnóstico es un fluoróforo, un colorante fluorescente, un radionúclido o una enzima.

106. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgG_1 , o una porción de unión al antígeno de la misma.

107. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgG_2 , IgG_3 o IgG_4 , o una porción de unión al antígeno de la misma.

108. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgA_1 , una inmunoglobulina IgA_2 o una inmunoglobulina IgM , o una porción de unión al antígeno de la misma.

109. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina IgD o IgE , o una porción de unión al antígeno de la misma.

110. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es un fragmento de unión al antígeno (Fab).

111. La inmunoglobulina conjugada de cualquiera de las reivindicaciones 59-110, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina humana, o una porción de unión al antígeno de la misma, o una inmunoglobulina humanizada, o una porción de unión al antígeno de la misma.

112. La inmunoglobulina conjugada de cualquiera de las reivindicaciones 59-110, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es una inmunoglobulina quimérica, o una porción de unión al antígeno de la misma, o una inmunoglobulina no humana, o una porción de unión al antígeno de la misma.

113. La inmunoglobulina conjugada de cualquiera de las reivindicaciones 59-110, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas.

114. La inmunoglobulina conjugada de cualquiera de las reivindicaciones 59-110, CARACTERIZADA PORQUE la relación entre el agente funcional y la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de la misma, es de entre 1:1 y 100:1 o entre 1:1 y 200:1.

115. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 58 o la reivindicación 59, CARACTERIZADA PORQUE el agente funcional es un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, y en donde la inmunoglobulina y el agente funcional se unen al mismo antígeno o se unen a antígenos diferentes.

116. Una composición farmacéutica, CARACTERIZADA PORQUE comprende la inmunoglobulina conjugada de cualquiera de las reivindicaciones 59-

115, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

117. Una inmunoglobulina conjugada, CARACTERIZADA PORQUE fue producida mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-58.