INMUNOGLOBULINAS CONJUGADAS CON LISINA C-TERMINAL

SOLICITUD RELACIONADA

[0001] La presente solicitud invoca prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU Nº: 62/269.138, presentada el 18 de diciembre, 2015, cuyo contenido completo se incorpora expresamente en la presente a modo de referencia.

CAMPO TÉCNICO

[0002] En la presente se proveen inmunoglobulinas conjugadas con lisina C-terminal y métodos para crear las mismas.

ANTECEDENTES

[0003] La utilidad de los anticuerpos monoclonales abarca desde la investigación básica hasta aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. La capacidad para conjugar anticuerpos a agentes funcionales extiende aún más su funcionalidad. La elaboración de anticuerpos conjugados habitualmente comprende la conjugación de un conector, fármaco u otro agente funcional con residuos reactivos de lisina cisteína en las cadenas pesada (HC) y liviana (LC) de un anticuerpo monoclonal (mAb). Véase Deonarain, *et al.*, “Emerging formats for next-generation antibody drug conjugates”, *Expert Opinion in Drug Discovery* (2015), 10(5): 463-481. La conjugación con lisina típicamente esta mediada por una química basada en succinimida (NHS) o basada en isotiocianato. La conjugación basada en cisteína requiere una reducción parcial del anticuerpo para romper algunos de los enlaces disulfuro entre cadenas, creando de esa manera cadenas laterales tiol libres. Los agentes funcionales que reaccionan con tiol pueden reaccionar luego con los grupos tiol libres en el anticuerpo para generar conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC).

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

[0004] Un avance reciente para utilizar tecnologías de conjugación específicas del sitio como una manera para producir un producto ADC homogéneo con una DAR definida ha conducido a varios métodos que incluyen modificación de cisteínas no apareadas, incorporación de aminoácidos no naturales y modificación enzimática específica del sitio. Si bien estos métodos permiten producir productos homogéneos, cada uno presenta desventajas. La conjugación basada en cisteínas necesita un paso adicional para eliminar una cisteína protectora, glutatión o aún una cadena liviana de la cisteína no apareada. Véase, por ejemplo, Junutula, *et al.,* "Site-Specific Conjugation of a Cytotoxic Drug to an Antibody Improves Therapeutic Index", *Nature Biotechnology*, (2008) 26: 925-932; Chen, *et al.*, "Charge-based Analysis of Antibodies with Engineered Cysteines", *MAbs* (2009) 1(6): 563-571; Gomez, *et al.*, "Effect of temperature, pH, dissolved oxygen, and hydrolysate on the formation of triple light chain antibodies in cell culture", *Biotechnol Progress* (2010), 26: 1438-1445. Además, se ha demostrado que la inestabilidad en suero de la química basada en maleimida utilizada actualmente para los conjugados basados en cisteína genera preocupaciones en cuanto a la pérdida potencia o a la toxicidad fuera del blanco. Alley, *et al.*, "Contribution of Linker Stability to the Activities of Anticancer Immunoconjugates", *Bioconjugate Chemistry* (2008) 19(3): 759-765; Shen, *et al.*, "Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates", *Nature*

Biotechnology (2012) 30: 184-189. La incorporación de aminoácidos no naturales necesita la expresión ya sea en un sistema basado en células modificadas genética o libre de células. Hallam, *et al.*, “Unnatural Amino Acids in Novel Antibody Conjugates”, *Future Med. Chem*. (2014) 6(11): 1309-1324. Además, la presencia de un aminoácido no natural podría desencadenar una respuesta inmunogénica en los pacientes. Sin embargo, las modificaciones enzimáticas específicas del sitio podrían utilizar potencialmente un aminoácido nativo, de tipo salvaje en la secuencia del anticuerpo, minimizando de esa manera la posibilidad de una inmunogenicidad. Además, los enlaces de postraducción formados típicamente por enzimas modificadoras de proteínas son muy estables.

[0005] La modificación enzimática de proteínas específica del sitio se ha explorado usando una familia de proteínas denominadas transglutaminasas que catalizan la formación de un enlace isopeptídico estable entre el grupo γ-carboxiamida (donante de acilo) de una glutamina y el grupo ε-amino (aceptor de acilo) de una lisina (véase la Figura 1) (véase, por ejemplo, Yokoyama, *et al.*, “Properties and Applications of Microbial Transglutaminase”, *Appl. Microbiol. Biotech*., (2004) 64: 47-454; Strop, “Versatility of Microbial Transglutaminase”, *Bioconjugate Chemistry*, (2014) 25(5): 855-862; Kieliszek*et al.,* “Microbial Transglutaminase and its Application in the Food Industry”, *Folia Microbiol* (2014) 59: 241-250). Recientemente, se han explorado varios grupos utilizando transglutaminasas como un medio para producir ADC (véase, por ejemplo, Josten *et al.,* “Use of Microbial Transglutaminase for the Enzymatic Biotinylation of Antibodies”, *J. Immunol Methods*, (2000) 240: 47-54; Mindt *et al.,* “Modification of Different IgG1 Antibodies via Glutamine and Lysine Using

Bacterial and Human Tissue Transglutaminase", *Bioconjugate Chemistry* (2008) 19(1): 271-278); Jeger, *et al.*, "Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. (2010) 49: 9995-9997; Strop *et al.,* "Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates", *Chem Biol* (2013) 20(2): 161-167; Dennler *et al.,* "Transglutaminase-Based Chemo-Enzymatic Conjugation Approach Yields Homogeneous Antibody-Drug Conjugates", *Bioconjugate Chemistry* (2014) 25(3): 569-578; Siegmund, *et al.,* "Locked by Design: A Conformationally Constrained Transglutaminase Tag Enables Efficient Site-Specific Conjugation", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. (2015) 54(45): 13420-13424). Las transglutaminasas están presentes en organismos que varían en un rango desde bacterias hasta seres humanos que están relacionadas estructural y funcionalmente, aún así, cada una está involucrada en procesos celulares específicos. Se ha utilizado ampliamente una transglutaminasa microbiana (transglutaminasa microbiana) aislada de la bacteria *Streptomyces mobaraensis* en toda la industria alimenticia para entrecruzar proteínas entre sí para diversas aplicaciones. Además de su bajo costo de manufacturación, es una técnica de conjugación atractiva debido a su capacidad para funcionar bajo un amplio rango de condiciones de pH, sales y temperatura.

[0006] A pesar de más de dos décadas de investigación, no se ha podido definir claramente la especificidad de sustrato de la transglutaminasa microbiana. En general, suelen ser preferidas las glutaminas o lisinas sobre bucles expuestos con residuos hidrofóbicos o de carga positiva adyacentes. Véase, Taguchi *et al.,* "Substrate specificity analysis of microbial

transglutaminase using proteinaceous protease inhibitors as natural model substrates", *J. Biochem*., (2000) 128: 415-425; Sugimura *et al.,* "Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from Streptomyces mobaraensis using a phage-displayed peptide library", *Arch. Biochem. Biophys*., (2008) 477: 379-383; Tagami*et al.,* "Substrate specificity of microbial transglutaminase as revealed by three-dimensional docking simulation and mutagenesis", *Protein Eng. Des. Sel*., (2009) 22: 747-752. Se ha encontrado que el contexto de la glutamina donante de acilo es más crítico que el de la lisina aceptora de acilo. Véase, por ejemplo, Ohtsuka *et al.,* "Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines", *J. Agric. Food Chem*., (2000) 48: 6230-6233; Ohtsuka *et al.,* "Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors", *Biosci. Biotechnol. Biochem*., (2000) 64: 2608-2613; Gundersen *et al.,* "Microbial transglutaminase displays broad acyl-aceptor substrate specificity", *Appl. Microbiol. Biotechnol*., (2013) 98: 219-230.

[0007] Debido a una menor especificidad por la amina aceptora de acilo de la transglutaminasa microbiana, hasta ahora la investigación se ha centrado solamente en la transamidación de los residuos glutamina del anticuerpo. Véase, Josten *et al.,* Mindt *et al.,* Jeger *et al.,* Strop *et al.,* Dennler *et al.,* y Siegmund *et al*., a los cuales se hizo referencia antes. La IgG humana está compuesta por un promedio de 80 lisinas, de los cuales se predice que un 80-90% están expuestas al solvente (Gautier *et al.,* "Lysine Conjugated Properties in Human IgGs Studied by Integrating High-Resolution Native Mass Spectrometry and Bottom-Up Proteomics", *Proteomics* (2015) 15(16): 2756-2765; no se muestran los datos), y el codón C-terminal de la IgG_1, IgG_2, IgG_3 y

la IgG_4 es una lisina (Ellison *et al., DNA* (1981) 1: 11-18; Ellison *et al.,* ("Ellison *et al.,* 2"), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, (1982) 79: 1984-1988; Ellison *et al., Nucleic Acid Res*., (1982) 10: 4071-4079). Sin embargo, la IgG derivada de suero carece de la lisina (Wang *et al., J. Immunol*. (1980) 125: 1048-1054; Edelman *et al., Proc Natl Acad. Sci. USA* (1969) 63: 78-85; Frangione *et al., Biochemistry* (1980) 19: 4304-4308; Pink *et al., Biochem. J*. (1970) 117: 33-47). Lo mismo se ha observado para la IgD (White *et al., Science* (1985) 228: 733-737; Lin *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1981) 78: 504-508; Shinoda *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981) 78: 785-789). La expresión recombinante de la IgG1 en células HEK293 y CHO también da como resultado una proteína que carece de la Lys447 C-terminal (Ellison *et al.*; Harris *et al., Eur. J. Biochem*. (1990) 194: 611-620; Harris, *J. Chromatogr. A* (1995) 705: 129-134; Dick *et al., Biotechnol. Bioeng*., (2008) 100: 1132-1143).

[0008] Hasta la fecha, los especialistas en el arte consideraron que el uso de un sustrato basado en un donante de amina para transamidar una lisina podría dar un producto ADC heterogéneo debido a la pluralidad de lisinas reactivas sobre la superficie de una IgG (Josten *et al.,* y Jeger *et al.*) y, por consiguiente, se ha desalentado el uso de un sustrato basado en un donante de amina para transamidar residuos lisina en las inmunoglobulinas.

[0009] Por lo tanto, existe la necesidad de modificaciones enzimáticas específicas del sitio de las inmunoglobulinas para crear conjugados que tengan un índice de conjugación predecible. Esto permitirá la creación de ADC con una DAR relativamente homóloga.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0010] La presente invención divulga sorprendentemente que, si bien

no se observó una modificación de lisinas de inmunoglobulina de tipo salvaje por la transglutaminasa microbiana, cuando se protegió un residuo de lisina C-terminal de una inmunoglobulina contra el clivaje por carboxipeptidasas usando una extensión de aminoácidos C-terminal, la transglutaminasa microbiana pudo utilizar la lisina C-terminal nativa como un aceptor de acilo. Sorprendentemente, la conjugación de la lisina C-terminal usando una transglutaminasa microbiana condujo a la incorporación específica del sitio y predecible de agentes funcionales conjugadas.

[0011] En un aspecto, en la presente se divulga un método para generar una inmunoglobulina conjugada, donde dicho método comprende incubar una inmunoglobulina con una transglutaminasa microbiana y un agente funcional que comprende un sustrato donante de acilo, en donde la inmunoglobulina comprende por lo menos un residuo de aminoácido después de una lisina C-terminal, en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina, y en donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, en donde la transglutaminasa microbiana conjuga la lisina C-terminal de la inmunoglobulina al residuo glutamina del sustrato donante de acilo en el agente funcional, generando de esa manera la inmunoglobulina conjugada.

[0012] En otro aspecto, en la presente se divulga un método para generar una inmunoglobulina conjugada, donde dicho método comprende i) incubar una inmunoglobulina con una transglutaminasa microbiana y un sustrato donante de acilo, en donde la inmunoglobulina comprende por lo menos un residuo de aminoácido después de una lisina C-terminal, y en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina y un grupo

reactivo, en donde la transglutaminasa microbiana conjuga la lisina C-terminal de la inmunoglobulina con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo, y ii) conjugar un agente funcional con el grupo reactivo del sustrato donante de acilo, en donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, generando de esa manera la inmunoglobulina conjugada.

[0013] En una forma de realización, el grupo reactivo del sustrato donante de acilo se conjuga con el agente funcional mediante química click.

[0014] En una forma de realización, la lisina C-terminal es la Lisina 447 (K447) en una cadena pesada de la inmunoglobulina.

[0015] En una forma de realización, la inmunoglobulina comprende un residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, y dicho un residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal es glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina o histidina. En otra forma de realización, la inmunoglobulina comprende un residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, y en donde dicho un residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no comprende prolina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina o arginina.

[0016] En una forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la Fórmula (I) o (II):

$(Z)_m$-Gln-$(L)_n$-(Y) (I)

(Y)-$(L)_n$-Gln-$(Z)_m$ (II)

[0017] en donde Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido; Gln es un residuo de aminoácido glutamina; cada L es de manera independiente un conector de cadena lineal o ramificada de entre 1 y 20

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

[0018] En una forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde L es una unidad de polietilenglicol (PEG) ($-O((CH_2)_2)-$), etilamina ($-NH((CH_2)_2)-$) o propilamina ($-NH((CH_2)_3)-$); y en donde n es 0, 1, 2 ó 3. En una forma de realización, L es una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, L comprende uno o más aminoácidos y una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), en donde Z es un grupo CBZ y en donde L es un aminoácido. En una forma de realización, L es Gly; m es 1; y n es 1. En otra forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (II), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 2, 3 ó 4; y por lo menos un grupo L es Gly; y por lo menos un grupo L es una unidad de PEG. En una forma de realización adicional, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (II), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 4; un grupo L es Gly y los tres grupos L remanentes son cada uno unidades de PEG.

[0019] En una forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la Fórmula (III) o (IV):

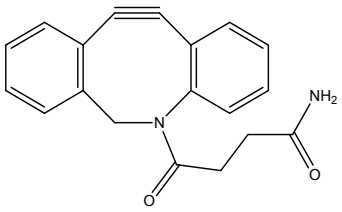
$(Z)_m$-Gln-$(L)_n$-(X) (III)

(X)-$(L)_n$-Gln-$(Z)_m$ (IV)

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

[0020] En una forma de realización, L es una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, cuando n es 2-5, por lo menos un grupo L comprende uno o más aminoácidos y otro L es una unidad de polietilenglicol (PEG). En una forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde L es una unidad de polietilenglicol (PEG) (-O($(CH_2)_2$)-), etilamina (-NH($(CH_2)_2$)-) o propilamina (-NH($(CH_2)_3$)-); y en donde n es 0, 1, 2 ó 3. En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), en donde Z es un grupo CBZ, y en donde L es un aminoácido. En una forma de realización, L es Gly; n es 1; y m es 1. En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (IV), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un grupo L es Gly.

[0021] En otra forma de realización, X es un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en (1R,8S,9s)-biciclo[6,1,0]non-4-in-9-

ilmetanol (BCN), 

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

[0022] En una forma de realización, el agente terapéutico es un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo, un agente quimioterapéutico, un agente farmacéutico, un agente radioactivo, un agente citotóxico, un antibiótico, una molécula pequeña, un ácido nucleico o un polipéptido. En otra forma de realización, el agente de diagnóstico es un fluoróforo, un colorante fluorescente, un radionúclido o una enzima.

[0023] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene dos residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, que comprenden un primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal y un segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal es cualquier residuo de aminoácido excepto ácido aspártico, ácido glutámico o prolina, y en donde el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina. En otra forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal es lisina o arginina. En otra forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina,

metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina.

[0024] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene tres residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, que comprenden un primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, un segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal y un tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, en donde el tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina. En una forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina.

[0025] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene cuatro residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, que comprenden un

primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, un segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, un tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal y un cuarto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, en donde el cuarto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina. En una forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina. En una forma de realización, el tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano,

arginina, serina y glicina.

[0026] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene cinco residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, que comprenden un primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, un segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, un tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, un cuarto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal y un quinto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, en donde el quinto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina. En una forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina. En una forma de realización, el tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido

glutámico o prolina. En una forma de realización, el tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina. En una forma de realización, el cuarto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el cuarto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina.

[0027] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene menos de 9 residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, y en donde el último residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina.

[0028] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene menos de 13 residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, y en donde el último residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina.

[0029] En una forma de realización, la transglutaminasa microbiana es de *Streptomyces mobarensis*.

[0030] En una forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina IgG_1. En otra forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina IgG_2, IgG_3 o IgG_4. En una forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina IgA_1, una IgA_2 o una IgM que no comprende una porción de cola. En una forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina IgD o IgE.

[0031] En una forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana o una inmunoglobulina humanizada. En una forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina no humana.

[0032] En una forma de realización, la inmunoglobulina comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. En una forma de realización, no hay entrecruzamiento intramolecular entre las dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina.

[0033] En una forma de realización, la relación de agente funcional a inmunoglobulina es de entre 1:1 y 2:1.

[0034] En otro aspecto, en la presente se describe una inmunoglobulina conjugada que comprende una inmunoglobulina y un agente funcional, en donde la inmunoglobulina comprende por lo menos un residuo de aminoácido después de una lisina C-terminal, el agente funcional comprende un sustrato donante de acilo, en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina y el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, en donde la lisina C-terminal de la inmunoglobulina se conjuga con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo del agente funcional.

[0035] En otro aspecto, en la presente se describe una inmunoglobulina conjugada que comprende una inmunoglobulina y un agente funcional, en donde la inmunoglobulina comprende por lo menos un residuo de aminoácido después de una lisina C-terminal, 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, el grupo reactivo se conjuga con un agente funcional, en donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.

[0036] En una forma de realización, la lisina C-terminal es la Lisina 447 (K447) en una cadena pesada de la inmunoglobulina.

[0037] En una forma de realización, la inmunoglobulina comprende un residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, y en donde dicho un residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal es glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina o histidina.

[0038] En otra forma de realización, la inmunoglobulina comprende un residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, y en donde dicho un residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es prolina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina o arginina.

[0039] En una forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la Fórmula (I) o (II):

$(Z)_m$-Gln-$(L)_n$-(Y) (I)

(Y)-$(L)_n$-Gln-$(Z)_m$ (II)

[0040] en donde Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido; Gln es un residuo de aminoácido glutamina; cada L es de manera

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

[0041] En una forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde L es una unidad de polietilenglicol (PEG) ($-O((CH_2)_2)-$), etilamina ($-NH((CH_2)_2)-$) o propilamina ($-NH((CH_2)_3)-$); y en donde n es 0, 1, 2 ó 3. En otra forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), en donde Z es un grupo CBZ y en donde L es un aminoácido. En una forma de realización, L es Gly; m es 1; y n es 1. En una forma de realización, el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (II), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un grupo L es Gly. En una forma de realización, L es una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, L comprende uno o más aminoácidos y una unidad de polietilenglicol (PEG).

[0042] En una forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la Fórmula (III) o (IV):

$(Z)_m$-Gln-$(L)_n$-(X) (III)

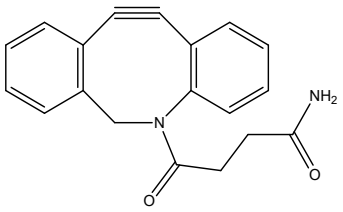
(X)-$(L)_n$-Gln-$(Z)_m$ (IV)

[0043] en donde Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de

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

[0044] En una forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde L es una unidad de polietilenglicol (PEG) ($-O((CH_2)_2)-$), etilamina ($-NH((CH_2)_2)-$) o propilamina ($-NH((CH_2)_3)-$); y en donde n es 0, 1, 2 ó 3. En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), en donde Z es un grupo CBZ, y en donde L es un aminoácido. En una forma de realización, L es Gly; m es 1; y n es 1. En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (IV), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un grupo L es Gly. En una forma de realización, L es una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, cuando n es 2-5, entonces por lo menos un grupo L comprende uno o más aminoácidos y uno o más L comprenden una unidad de polietilenglicol (PEG).

[0045] En una forma de realización, X es un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en (1R,8S,9s)-biciclo[6,1,0]non-4-in-9-

ilmetanol (BCN), 

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

[0046] En una forma de realización, el agente terapéutico es un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo, un agente quimioterapéutico, un agente farmacéutico, un agente radioactivo, un agente citotóxico, un antibiótico, una molécula pequeña, un ácido nucleico o un polipéptido. En otra forma de realización, el agente de diagnóstico es un fluoróforo, un colorante fluorescente, un radionúclido o una enzima.

[0047] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene dos residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, que comprenden un primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal y un segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal.

[0048] En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal es cualquier residuo de aminoácido excepto ácido aspártico, ácido glutámico o prolina, y en donde el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal es lisina o arginina.

[0049] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene tres

residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, que comprenden un primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, un segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal y un tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, en donde el tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina. En una forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina.

[0050] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene cuatro residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, que comprenden un primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, un segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, un tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal y un cuarto residuo de aminoácido

después de la lisina C-terminal, en donde el cuarto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina. En una forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina. En una forma de realización, el tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina.

[0051] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene cinco residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, que comprenden un

primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, un segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, un tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, un cuarto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal y un quinto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, en donde el quinto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina. En una forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina. En una forma de realización, el tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina,

alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina. En una forma de realización, el cuarto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal no es ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, el cuarto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, cisteína, triptofano, arginina, serina y glicina.

[0052] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene menos de 9 residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, y en donde el último residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina.

[0053] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene menos de 13 residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, y en donde el último residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina.

[0054] En una forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina IgG_1. En otra forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina IgG_2, IgG_3 o IgG_4. En una forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina IgA_1, una IgA_2 o una IgM que no comprende una porción de cola. En una forma de realización, la

inmunoglobulina es una inmunoglobulina IgD o IgE.

[0055] En una forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana o una inmunoglobulina humanizada. En una forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina no humana.

[0056] En una forma de realización, la inmunoglobulina comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. En una forma de realización, no hay entrecruzamiento intramolecular entre las dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina.

[0057] En una forma de realización, la relación de agente funcional a inmunoglobulina es de entre 1:1 y 2:1.

[0058] En una forma de realización, el agente funcional es un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, y en donde la inmunoglobulina y el agente funcional se unen al mismo antígeno o se unen a antígenos diferentes.

[0059] En otro aspecto, en la presente se describe un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina conjugada. En otro aspecto, en la presente se describe un plásmido que comprende un ácido nucleico. En otra forma de realización, en la presente se describe una célula aislada que comprende un plásmido.

[0060] En otro aspecto, en la presente se describe una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina conjugada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0061] En un aspecto, en la presente se describe una inmunoglobulina conjugada producida mediante cualquiera de los métodos que se describen en

la presente.

[0062] En una forma de realización, el método además comprende un paso de purificar la inmunoglobulina conjugada con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo antes de conjugar el agente funcional con el grupo reactivo del sustrato donante de acilo. En una forma de realización, el paso de purificación comprende métodos basados en el tamaño, tales como cromatografía o diafiltración. En otra forma de realización, el paso de purificación incluye una separación basada en la carga, tal como cromatografía de intercambio aniónico o de intercambio catiónico. En otra forma de realización, el paso de purificación comprende un paso basado en la afinidad, tal como cromatografía con la Proteína A o la Proteína G.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0063] El resumen, así como la siguiente descripción detallada, se comprenderá mejor si se lee junto con las figuras adjuntas. A los efectos de ilustrar los métodos, y las inmunoglobulinas conjugadas, divulgados en las figuras se muestran ejemplos de formas de realización; sin embargo, los métodos y las inmunoglobulinas conjugadas no se limitan a las formas de realización específicas divulgadas. En las Figuras:

[0064] En la Figura 1 se muestra una reacción de una transglutaminasa, en donde la transglutaminasa cataliza la formación de un enlace isopeptídico entre una glutamina donante de acilo y una lisina aceptora de acilo con liberación de una molécula de amoníaco.

[0065] En la Figura 2 se muestran las estructuras de ejemplos de sustratos donantes de acilo Z-Gln-Gly.

[0066] En la Figura 3 se muestran las posibles rutas para sintetizar

algunos de los ejemplos de sustratos donantes de acilo Z-Gln-Gly.

[0067] En la Figura 4, que comprende las Figuras 4A, 4B y 4C, se muestran lisinas expuestas a solventes en las estructuras cristalinas de Fab y Fc de la IgG_1 humana; (A) Fab VH-CH1 y Vκ-Cκ, (B) Fab VH-CH1 y Vλ-Cλ, y (C) Fc CH2 y CH3 que se determinaron usando Discovery Studio 4.5 con un radio de sonda de 1,4 Å y están resaltadas en amarillo.

[0068] En la Figura 5 se muestran las secuencias de los dominios constantes de la IgG_1 humana (SEQ ID N°: 40), kappa (SEQ ID N°: 41) y lambda (SEQ ID N°: 42). Las lisinas del dominio constante expuestas al solvente basado en 1FC1 (Fcγ), 4F3F (CH1 y Cκ) y 4HK0 (Cλ) están resaltadas con rojo; las lisinas en los bucles están subrayadas. Los dominios constantes se numeran de acuerdo con el sistema de numeración EU.

[0069] En la Figura 6, que comprende las Figuras 6A, 6B, 6C, 6D, 6E y 6F, se muestra un análisis mediante ESI-MS de anticuerpos incubados con un donante de acilo y una transglutaminasa microbiana. Los anticuerpos se incubaron con un exceso molar 50X de Z-Gln-Gly-CAD-biotina y 1 U/ml de transglutaminasa microbiana durante la noche a 37 °C. Después de una digestión con IdeS y reducción, se determinaron las masas de LC, Fd y Fc mediante ESI-MS.

[0070] En la Figura 7 se muestra un análisis mediante ESI-MS de las reacciones del anticuerpo 01 y la transglutaminasa microbiana K-Tag. Los mAb se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una transglutaminasa microbiana durante la noche a 37 °C. Después de una deglicosilación y reducción, se determinaron las masas HC y LC de (A) anticuerpo 01, (B) anticuerpo 01-HC-KTag y (C) anticuerpo 01-LC-KTag mediante ESI-MS.

[0071] La Figura 8, que comprende las Figuras 8A, 8B y 8C, ilustra el análisis mediante ESI-MS de extensiones C-terminales del anticuerpo 01. Se incubaron (A) el anticuerpo 01 MAbs, (B) el anticuerpo 01-L y (C) el anticuerpo 01-LL con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una transglutaminasa microbiana durante la noche a 37 °C y las masas se analizaron mediante ESI-MS como en la Figura 7.

[0072] La Figura 9, que comprende las Figuras 9A-9B, ilustra la conjugación en un solo paso del fármaco con Lys447. Se digirieron (A) el anticuerpo 01-L y (B) el anticuerpo 01-L con Z-Gln-Gly-PEG_2-AuF y una transglutaminasa microbiana a 37 °C durante la noche con IdeS y se redujeron con DTT para generar los fragmentos LC, Fd y Fc. Se monitoreó la absorbancia a 280 nm (AU280) y la corriente iónica total (TIC) de las muestras se monitorearon mediante LC-MS de fase reversa como en la sección de Métodos.

[0073] En la Figura 10 se muestra el SDS-PAGE de los mAbs diméricos. Se mezcló el anticuerpo 01-L transamidado ya sea con Z-Gln-Gly-N_3 o Z-Gln-Gly-PEG_3-BCN y se incubaron durante la noche a 22 °C. Las muestras se redujeron y se analizaron mediante SDS-PAGE usando un gel de bis-Tris poliacrilamida al 4-12%. La masa del dímero HC-HC es de aproximadamente 110 kDa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0074] Los métodos y las inmunoglobulinas conjugadas que se divulgan se comprenderán más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada junto con las figuras adjuntas, que forman parte de esta divulgación. Se comprenderá que los métodos y las inmunoglobulinas

conjugadas que se divulgan no se limitan a las formas de realización específicas que se describen y/o muestran en la presente, y que la terminología usada en la presente sirve para describir las formas de realización particulares a modo de ejemplo solamente y no pretende limitar los métodos o inmunoglobulinas conjugadas reivindicadas.

[0075] A menos que específicamente se defina de otra manera, cualquier descripción de un posible mecanismo o modo de acción o razón de mejora solamente se ofrece a efectos ilustrativos, y los métodos y las inmunoglobulinas conjugadas que se divulgan no se verán restringidos por la precisión o falta de la misma de cualquiera de dichos mecanismos o modos de acción o razones de mejora sugeridos.

[0076] En todo este texto, las descripciones se refieren a inmunoglobulinas conjugadas y a los métodos para generar las mismas. Cuando la divulgación describe o reivindica una característica o forma de realización asociada con una inmunoglobulina conjugada, dicha característica o forma de realización es igualmente aplicable a los métodos para generar las mismas. Asimismo, donde la divulgación describe o reivindica una característica o forma de realización asociada con un método para generar una inmunoglobulina conjugada, dicha característica o forma de realización es aplicable igualmente a la inmunoglobulina conjugada.

[0077] La referencia a un valor numérico particular incluye por lo menos dicho valor particular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Cuando se expresa un rango de valores, otra forma de realización incluye entre dicho un valor particular y/o el otro valor particular. Además, la referencia a los valores definidos en rangos incluyen cada uno y todos los

valores incluidos en dicho rango. Todos los rangos son inclusivos y combinables.

[0078] Cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del término "aproximadamente" precedente, se comprenderá que dicho valor específico constituye otra forma de realización.

[0079] Se podrá apreciar que algunas características de los métodos y las inmunoglobulinas conjugadas divulgadas se describen en la presente, a efectos de una mayor claridad, en el contexto de formas de realización separadas, también se pueden proveer combinadas en una única forma de realización. Del mismo modo, varias características de los métodos e inmunoglobulinas conjugadas que, por razones de brevedad, se describen en el contexto de una única forma de realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación.

[0080] Según se usa en la presente, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la ” incluyen las formas en plural.

[0081] En toda la Descripción y en las reivindicaciones se utilizarán diversos términos relacionados con los aspectos de la divulgación. Dichos términos tendrán el significado que habitualmente tienen en el arte, a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente se interpretarán de una manera coherente con las definiciones provistas en la presente.

[0082] El término “aproximadamente”, cuando se usa con referencia a rangos numéricos, valores de corte o valores específicos, se usa para indicar que los valores indicados pueden variar hasta tanto como un 10% con respecto al valor enumerado. Por consiguiente, el término “aproximadamente” se usa

para abarcar variaciones de ± 10% o menos, variaciones de ± 5% o menos, variaciones de ± 1% o menos, variaciones de ± 0,5% o menos o variaciones de ± 0,1% o menos con respecto al valor especificado.

[0083] Un “aminoácido ácido” se refiere a un aminoácido que presenta una carga negativa a pH fisiológico. Los aminoácidos hidrofóbicos codificados genéticamente incluyen aspartato, glutamato, asparagina y glutamina.

[0084] El término “sustrato donante de acilo” se refiere a un grupo que tiene un grupo acilo terminal. Preferiblemente, el “sustrato donante de acilo” comprende un residuo glutamina. Un sustrato donante de acilo puede contener opcionalmente otro grupo reactivo. En una primera forma de realización, el sustrato donante de acilo está conectado de manera covalente a un agente funcional. En una segunda forma de realización, el sustrato donante de acilo no está conectado a un agente funcional. En una forma de realización, el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina y un grupo reactivo. En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo comprende uno o más conectores, como se describirá con más detalle en la presente. En cualquiera de las formas de realización precedentes, opcionalmente hay un conector entre el sustrato donante de acilo y el agente funcional o entre el sustrato donante de acilo y el grupo reactivo.

[0085] El término "anticuerpo", según se usa en la presente, se refiere en un sentido general a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L). El término “anticuerpo”, según se usa en la presente, también se refiere a cualquier porción de unión al antígeno, mutante, variante o derivado de una molécula de inmunoglobulina, que retiene las características esenciales

de unión al epitope de una molécula de Ig. Estos formatos de anticuerpos mutantes, variantes o derivados son conocidos en la técnica y en la presente se describirán formas de realización no limitantes de los mismos. En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo no humano.

[0086] En un anticuerpo completo, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada como HCVR o VH en la presente) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de la cadena liviana (abreviada como LCVR o VL en la presente) y una región constante de la cadena liviana. La región constante de la cadena liviana consiste en un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse además en regiones hipervariables, conocidas como regiones de determinación de la complementariedad (CDR), y separadas por regiones conservadas conocidas como regiones de marco de trabajo (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2) o subclase.

[0087] El término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo"), tal como se usa en la presente, se

refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo completo. Estas formas de realización de anticuerpos también pueden tener formatos biespecíficos, de especificidad doble o multiespecíficos, es decir, pueden unirse específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión que abarca el término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos entre sí en la región bisagra a través de un enlace disulfuro; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios FL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341: 544-546, Winter et al., publicación PCT WO 90/05144 A1, incorporada en la presente a modo de referencia), que comprende un solo dominio variable; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, a saber, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden conectarse uno con otro usando un conector sintético que les permita prepararlos como una sola cadena de proteína, donde las regiones VL y VH se apareen para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.,* (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston *et al.,* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena simple también se consideran dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras

formas de anticuerpos, tales como los anticuerpos bivalentes o *diabodies*. Los *diabodies* son anticuerpos bivalentes y biespecíficos donde los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena de polipéptidos, pero usando un conector que es demasiado corto para que los dos dominios se combinen en la misma cadena, que lo que se fuerza el apareamiento de dichos dominios con dominios complementarios de una cadena diferente y la formación de dos sitios de unión al antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.,* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al., (1994) *Structure* 2: 1121-1123). Estas porciones de unión a anticuerpos son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel eds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 páginas (ISBN 3-540-41354-5).

[0088] Un “aminoácido básico” se refiere a un aminoácido que presenta una carga positiva a pH fisiológico. Los aminoácidos hidrofóbicos codificados genéticamente incluyen histidina, lisina y arginina.

[0089] Según se usa en la presente, el término “muestra biológica” se refiere a una muestra obtenida de un sujeto, que incluye una muestra de un tejido o fluido de origen biológico obtenido *in vivo* o *in vitro*. Dichas muestras pueden comprender, pero en un sentido no taxativo, un fluido corporal (por ejemplo*,* sangre, plasma sanguíneo, suero, leche, fluido espinal, ascites u orina), órganos, tejidos, fracciones y células aisladas de mamíferos incluyendo seres humanos. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de la muestra biológica que incluye tejidos (por ejemplo*,* porciones de secciones de un órgano o tejido). Las muestras biológicas también pueden incluir extractos de una muestra biológica, por ejemplo, un antígeno de un fluido biológico *(*por ejemplo*,* sangre u orina).

[0090] El término “lisina C-terminal” se refiere al extremo C-terminal de la cadena pesada de una inmunoglobulina. Preferiblemente, hay por lo menos un residuo de aminoácido después de una lisina C-terminal. En una forma de realización, en donde solo hay un residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1), el residuo de aminoácido adyacente directamente a la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina e histidina. En el caso agregar más de un residuo de aminoácido a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1, +2, etc.), el residuo de aminoácido adyacente directamente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) se puede seleccionar entre cualquier aminoácido excepto ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. En una forma de realización, cuando se agregan dos residuos de aminoácidos a la lisina C-terminal, el residuo de aminoácido adyacente directamente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) es cualquier aminoácido excepto ácido aspártico, ácido glutámico o prolina, y el segundo residuo de aminoácido (posición de aminoácido +2) después de la lisina C-terminal se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina. En una forma de realización, cuando se agregan dos residuos de aminoácidos a la lisina C-terminal, el primer residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) es lisina o arginina.

[0091] En una forma de realización, hay un residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1). En otra forma de

realización, hay dos residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal (posiciones de aminoácido +1 y +2). En aún otra forma de realización, hay tres (posiciones de aminoácido +1, +2 y +3), cuatro (posiciones de aminoácido +1, +2, +3 y +4), cinco (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4 y +5), seis (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5 y +6), siete (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6 y +7), ocho (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7 y +8), nueve (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8 y +9), diez (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9 y +10), once (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10 y +11), doce (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11 y +12), trece (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12 y +13), catorce (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13 y +14), quince (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14 y +15), dieciséis (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15 y +16), diecisiete (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16 y +17), dieciocho (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17 y +18), diecinueve (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, +18 y +19) o veinte (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, +18, +19 y +20) residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal.

[0092] En una forma de realización, los residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal no incluyen GTYFQAYGT (SEQ ID N°: 1). En

una forma de realización, los residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal no incluyen GECTYFQAYGCTE (SEQ ID N°: 2). En una forma de realización, los residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal no incluyen GENTYFQAYGNTE (SEQ ID N°: 3).

[0093] En una forma de realización, la lisina C-terminal es la Lisina 447 de la IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4. En otra forma de realización, la lisina C-terminal es la lisina C-terminal de IgD o IgE. En otra forma de realización, el término "lisina C-terminal" se refiere al último residuo de lisina antes de la porción de cola de la IgA_1, IgA_2 o IgM. En una forma de realización, se elimina la porción de cola de la IgA_1, IgA_2 o IgM. En una forma de realización, no se elimina la porción de cola de la IgA_1, IgA_2 o IgM. Las secuencias de porciones de cola de los anticuerpos se muestran a continuación:

IgA_1 PTHVNVSVVMAEVDGTCY (SEQ ID N°: 4)

IgA_2 PTHVNVSVVMAEVDGTCY (SEQ ID N°: 4)

IgM PTLYNVSLVMSDTAGTCY (SEQ ID N°: 5)

[0094] En otra forma de realización, se puede eliminar uno o más residuos de aminoácidos, por ejemplo, suprimirlo del extremo C-terminal de la cadena pesada de una inmunoglobulina, y se puede agregar un residuo lisina C-terminal, seguido por al menos un residuo de aminoácido adicional, a la inmunoglobulina. Por ejemplo, se pueden suprimir los residuos de aminoácidos 446 y 447 de una inmunoglobulina IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4, y se puede agregar una lisina C-terminal seguido por al menos un residuo de aminoácido adicional, en donde una transglutaminasa microbiana puede conjugar luego la lisina C-terminal de la inmunoglobulina con un residuo glutamina de un sustrato donante de acilo. En otras palabras, la lisina C-terminal puede estar presente,

por ejemplo, en la posición de aminoácido 446 de una inmunoglobulina, si la inmunoglobulina ha sido mutada para eliminar las posiciones de aminoácido 446 y 447 de tipo salvaje. Luego se puede agregar uno o más residuos de aminoácidos adicionales a la lisina C-terminal, por ejemplo, en las posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, etc., como se describe en la presente. En una forma de realización, se puede eliminar uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez residuos de aminoácidos, por ejemplo, suprimirlos del extremo C-terminal de la cadena pesada de una inmunoglobulina, y se puede agregar un residuo lisina C-terminal, seguido por al menos un residuo de aminoácido adicional a la inmunoglobulina, por ejemplo, en las posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4, etc., como se describe en la presente.

[0095] En otra forma de realización, se elimina el dominio CH3 del extremo C-terminal de la cadena pesada de una inmunoglobulina, y se puede agregar un residuo lisina C-terminal, seguido por al menos un residuo de aminoácido adicional a la inmunoglobulina. En otra forma de realización, se puede eliminar tanto el dominio CH2 como el dominio CH3 del extremo C-terminal de la cadena pesada de una inmunoglobulina, y se puede agregar un residuo lisina C-terminal, seguido por al menos un residuo de aminoácido adicional a la inmunoglobulina. En otra forma de realización, se pueden eliminar la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 del extremo C-terminal de la cadena pesada de una inmunoglobulina, y se puede agregar un residuo lisina C-terminal, seguido por al menos un residuo de aminoácido adicional, a la inmunoglobulina. En aún otra forma de realización, se pueden eliminar el dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 del extremo C-terminal de la cadena pesada de una inmunoglobulina, y se

puede agregar un residuo lisina C-terminal, seguido por al menos un residuo de aminoácido adicional, a la inmunoglobulina.

[0096] El término “química click” se refiere a reacciones particulares para la síntesis y/o conjugación de proteínas que son de alto rendimiento, muy selectivas, confiables y limpias. Véase, por ejemplo, King *et al.,* “Developments in the Field of Bioorthagonal Bond Forming Reactions – Past and Present Trends”, *Bioconjug. Chem*., (2014) 25(5): 825-839; McKay et al., “Click Chemistry in Complex Mixtures: Bioorthagonal Bioconjugation”, *Chem. Biol*., (2014) 21(9): 1075-1101.

[0097] El término “quimerizado”, “quimérico”, “anticuerpo quimérico” y términos similares se refieren a una inmunoglobulina que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena liviana, es decir, una región de unión al antígeno, de una fuente o especie y por lo menos una porción de una región constante de la cadena pesada y una región constante de la cadena liviana derivadas de una fuente o especie diferente. Estas porciones se pueden unir químicamente mediante técnicas convencionales (por ejemplo, síntesis) o se pueden preparar como un polipéptido contiguo usando técnicas de ingeniería genética (por ejemplo, se puede expresar ADN que codifica las porciones de proteínas del anticuerpo quimérico para producir una cadena de polipéptidos contiguos). Otras formas de “inmunoglobulinas quiméricas” que abarca la presente divulgación son aquellas en donde se ha modificado o cambiado la clase o subclase con respecto a la inmunoglobulina original (también denominadas “inmunoglobulinas de cambio de clase”). En toda la divulgación, las inmunoglobulinas quiméricas se denominan “xi.” En la presente, una

“inmunoglobulina quimérica” y términos similares se refieren a la secuencia de la inmunoglobulina antes que al proceso usado para generar el anticuerpo.

[0098] Según se usa en la presente, “Lys447” o “Lisina 447” se refiere a un residuo lisina en la posición de aminoácido 447 de la región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina (numerada usando el sistema de numeración EU) y que es, por ejemplo, el codón C-terminal en la IgG_1, IgG_2, IgG_3,IgG_4, IgD e IgE.

[0099] Según se usa en la presente, un “agente funcional” se refiere a un agente que presenta propiedades terapéuticas, de diagnóstico u otras propiedades funcionales. En una forma de realización, un agente funcional puede ser un agente terapéutico. En otra forma de realización, un agente funcional puede ser un agente de diagnóstico. Los agentes funcionales pueden ser moléculas grandes o moléculas pequeñas. Los agentes funcionales de moléculas grandes incluyen, pero en un sentido no taxativo, un anticuerpo y porciones de unión al antígeno del mismo. Los agentes funcionales de moléculas pequeñas incluyen, pero en un sentido no taxativo, agentes quimioterapéuticos, agente citotóxicos, antibióticos, otros compuestos orgánicos que pueden regular un proceso biológico (por ejemplo, fármacos) y polipéptidos.

[00100] El término “humanizado”, “inmunoglobulina humanizada” y términos similares se refieren a inmunoglobulinas en las cuales se han modificado las regiones de marco o las “regiones determinantes de complementariedad” (CDR) para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina parental. Por lo general, las inmunoglobulinas humanizadas

son inmunoglobulinas humanas (inmunoglobulina receptora) en donde los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (inmunoglobulina donante), tal como de ratón, rata, conejo o un primate no humano, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos FWR de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. Además, las inmunoglobulinas humanizadas pueden comprender residuos que no se observan en la inmunoglobulina receptora o la inmunoglobulina donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el desempeño de la inmunoglobulina. En general, la inmunoglobulina humanizada comprenderá sustancialmente todos entre por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en donde todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FWR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. La inmunoglobulina humanizada también puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de una inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Riechmann, L., *et al., Nature* 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M. S., *et al., Nature* 314 (1985) 268-270. En toda la divulgación, las “inmunoglobulinas humanizadas” se denominan “zu”. En la presente, una “inmunoglobulina humanizada” y términos similares se refieren a la secuencia de la inmunoglobulina antes que al proceso usado para generar la inmunoglobulina.

[00101] El término “agente de diagnóstico” se refiere a un compuesto que puede ser de utilidad para estudios de obtención de imágenes *in vivo* tales

como CT, MRI y rayos X y/o estudios de obtención de imágenes *in vitro*. Los ejemplos no taxativos de agentes de diagnósticos incluyen un fluoróforo, un colorante fluorescente, un radionúclido y una enzima.

[00102] El término “inmunoglobulina donante” se refiere a una inmunoglobulina no humana que contribuye con secuencias de aminoácidos de sus regiones variables, CDR u otros fragmentos funcionales o análogos de los mismos a la inmunoglobulina humanizada, y de esa manera le provee a la inmunoglobulina humanizada la especificidad antigénica y la actividad neutralizante características de la inmunoglobulina donante.

[00103] El término “inmunoglobulina receptora” se refiere a una inmunoglobulina heteróloga para la inmunoglobulina donante, que provee las secuencias de aminoácidos de sus regiones de marco de la cadena pesada y/o liviana y/o sus regiones constantes de las cadenas pesada y/o liviana a la inmunoglobulina humanizada. La inmunoglobulina receptora puede derivar de cualquier mamífero. En formas de realización preferidas, la inmunoglobulina receptora no es inmunogénica en humanos. Preferiblemente, la inmunoglobulina receptora es una inmunoglobulina humana.

[00104] La “humanización” se refiere a un proceso para generar una inmunoglobulina humanizada e incluye cualquier proceso para generar inmunoglobulinas humanizadas que tengan las características anteriores, que incluyen, pero en un sentido no taxativo, humanización *in silico*, modificar CDR de especies/huésped introduciéndolas en inmunoglobulinas humanas, sustituyendo los residuos de la región de marco de una inmunoglobulina quimérica para que coincida con una correspondiente región de marco humana, etc.

[00105] Una “inmunoglobulina”, según se usa en la presente, se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina que incluyen las cadenas livianas kappa y lambda y las cadenas pesadas alfa, gamma, delta, épsilon y mu. Las “cadenas livianas” de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de la región variable por el extremo NH_2-terminal (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda por el extreme COOH-terminal. Las “cadenas pesadas” de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos), están codificadas de manera similar por un gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante mencionados antes, por ejemplo, gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). Las “inmunoglobulinas” incluyen: (a) polipéptidos de inmunoglobulina, es decir, polipéptidos de la familia de inmunoglobulinas que contiene un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno específico, incluyendo todos los isotipos de inmunoglobulina (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD e IgY), clases (por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, IgA_2), subclases y varias formas monoméricas y poliméricas de cada isotipo, a menos que se especifique de otra manera; y (b) variantes sustituidas de manera conservadora de dichos polipéptidos de inmunoglobulina que se unen de manera inmunoespecífica al antígeno. Las inmunoglobulinas se describen en general, por ejemplo, en Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988).

[00106] Una forma de la inmunoglobulina divulgada en la presente

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

[00107] Además de anticuerpos, las inmunoglobulinas pueden existir en una variedad de formas adicionales que incluyen, por ejemplo, fragmentos de unión al antígeno o porciones de una inmunoglobulina de longitud completa, tales como fragmentos Fv, Fab, $(Fab')_2$ y Fv; y formatos de anticuerpo alternativos tales como inmunoglobulinas de cadena simple (scFV y scFab), *diabodies*, *triabodies*, *tetrabodies*, anticuerpos lineales y anticuerpos multiespecíficos, por nombrar unos pocos. Véase, por ejemplo, James D. Marks, *Antibody Engineering*, Capítulo 2, Oxford University Press (1995) (Carl K. Borrebaeck, Ed.).

[00108] En una forma de realización, una inmunoglobulina puede comprender un fragmento Fab. En otra forma de realización, una inmunoglobulina puede comprender un dominio CH3. En otra forma de realización, una inmunoglobulina puede comprender una cadena pesada.

[00109] Según se usa en la presente, el término “inmunoespecíficamente” se refiere a la capacidad de una inmunoglobulina para unirse de manera específica con un antígeno contra el cual se generó la inmunoglobulina y no se une específicamente a otros péptidos o proteínas. Una inmunoglobulina que se une inmunoespecíficamente a un antígeno contra el

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

[00110] Un “conector”, según se usa en la presente, se refiere a un espaciador, que puede ser de cadena lineal o ramificada, para unir una inmunoglobulina (a través de un sustrato donante de acilo) a un agente funcional o un grupo reactivo. Dichos conectores pueden ser clivables (por ejemplo, lábil a ácidos o clivables por proteasas) o no clivables. En una forma de realización, un conector es una unidad de polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, un conector comprende uno o más aminoácidos y una unidad de polietilenglicol (PEG).

[00111] El término “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo que deriva de un solo clon celular, que incluye cualquier clon celular eucariota o procariota, o un clon de fago, y no al método con el cual se produjo. Un anticuerpo monoclonal presenta una sola especificidad y afinidad de unión por un epitope particular. El término “anticuerpo monoclonal” no se limita a los

anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridomas.

[00112] El término “nativo” se refiere a la secuencia de inmunoglobulina de tipo salvaje de la especie en la cual se deriva la inmunoglobulina.

[00113] Según se usa en la presente, la “identidad porcentual” y términos similares se usa para describir las relaciones de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos, polinucleótidos, proteínas o polipéptidos, y se comprende en el contexto y junto con términos que incluyen: (a) secuencia de referencia, (b) ventana de comparación, (c) identidad de secuencia y (d) porcentaje de identidad de secuencia.

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

nucleótidos, o cualquier número entero de ellos o entre ellos.

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

(c) Los métodos de alineamiento de secuencias para realizar una comparación son bien conocidos en el arte. El alineamiento óptimo de secuencias para una comparación se puede efectuar con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math*., 2: 482, 1981; con el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol*., 48: 443, 1970; mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8: 2444, 1988; mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos, que incluyen, pero en

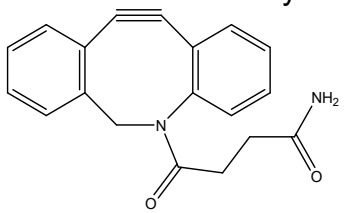
un sentido no taxativo, CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, Calif., GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 7 Science Dr. Madison, Wis., EEUU; el programa CLUSTAL está bien descrito en Higgins y Sharp, *Gene*, 73: 237-244, 1988; Corpet, *et al., Nucleic Acids Research*, 16: 881-90, 1988; Huang, *et al., Computer Applications in the Biosciences*, 8: 1-6, 1992; y Pearson, *et al., Methods in Molecular Biology*, 24: 7-331, 1994. La familia de programas BLAST que se puede usar en las búsquedas de similitud de bases de datos incluye, BLASTN para secuencias de consulta de nucleótidos contra secuencias de la base de datos de nucleótidos; BLASTX para las secuencias de consulta de nucleótidos contra secuencias de la base de datos de proteínas; BLASTP para las secuencias de consulta de proteínas contra secuencias de la base de datos de proteínas; TBLASTN para las secuencias de consulta de proteínas contra secuencias de la base de datos de nucleótidos; y TBLASTX para las secuencias de consulta de nucleótido contra secuencias de la base de datos de nucleótidos. Véase, *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 19, Ausubel, *et al.,* Eds., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 1995. En el futuro, seguramente habrá nuevas versiones de los programas precedentes o programas completamente nuevas disponibles en el futuro, y se podrán utilizar con la presente divulgación.

(d) La “identidad porcentual” es el valor determinado por comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima en una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones,

sustituciones o supresiones (es decir, faltas de coincidencia o huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones, sustituciones o supresiones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando la cantidad de posiciones en las cuales existe una base de ácido nucleico idéntica en ambas secuencias, a fin de obtener la cantidad de posiciones de coincidencia, dividiendo la cantidad de posiciones de coincidencia por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando la cantidad total de posiciones por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

[00114] Una “cantidad farmacéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de una inmunoglobulina que permite tratar a un sujeto.

[00115] Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a los componentes de una formulación farmacéutica para una inmunoglobulina descrita en la presente para su administración a un sujeto. Por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable se puede basar en liposomas, basar en lípidos y/o basar en nanopartículas.

[00116] El término “grupo reactivo”, según se usa en la presente, se refiere a un grupo químico funcional que puede reaccionar con otros compuestos, tales como agentes funcionales, para formar por lo menos un enlace covalente. En una forma de realización, los grupos reactivos son reactivos en las reacciones de acoplamiento de química click. Los ejemplos no taxativos de grupos reactivos incluyen (1R,8S,9s)-biciclo[6,1,0]non-4-in-9-ilmetanol (BCN), 

(DBCO), trans-cicloocteno(TCO),

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

[00117] El término “sujeto”, según se usa en la presente, se refiere a un organismo humano o no humano. Por lo tanto, los métodos, inmunoglobulinas e inmunoglobulinas conjugadas que se describen en la presente son aplicables a enfermedades y condiciones humanas y veterinarias. Los sujetos pueden ser “pacientes”, es decir, seres humanos vivos u organismos no humanos que reciben cuidado médico por una enfermedad o condición, u organismos humanos o no humanos sin una enfermedad definida que están siendo investigados por signos de patología o por la presencia/ausencia de una condición particular.

[00118] Una “sustitución” se refiere al reemplazo de un residuo de aminoácido por otro. La “sustitución” incluye, por ejemplo, mutaciones de sentido erróneo en uno o más pares de bases de ADN que codifican el residuo de aminoácido o modificación de la proteína para intercambiar un aminoácido por otro.

[00119] Según se usa en la presente, “tratar” y términos similares se refieren a reducir la severidad y/o frecuencia de los síntomas de una enfermedad, eliminar los síntomas de una enfermedad y/o la causa subyacente de dichos síntomas, reducir la frecuencia o probabilidad de los síntomas de la enfermedad y/o su causa subyacente y mejorar o remediar el daño causado, de manera directa o indirecta, por la enfermedad.

[00120] El término “agente terapéutico” se refiere a una molécula grande o pequeña que puede ser administrada a un sujeto que lo necesita para tratar una condición. Los agentes terapéuticos se pueden administrar para

tratar, o prevenir el inicio, demorar el progreso o aliviar uno o más síntomas de una condición médica en sujetos que sufren de la misma. Los agentes terapéuticos incluyen, pero en un sentido no taxativo, un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo, un agente quimioterapéutico, un agente radioactivo, un agente citotóxico, un antibiótico, etc. En una forma de realización, el agente terapéutico es una molécula pequeña. En otra forma de realización, el agente terapéutico es un polipéptido.

[00121] Según se usa en la presente, “90% idéntica a” abarca por lo menos 90% idéntica, 91% idéntica, 92% idéntica, 93% idéntica, 94% idéntica, 95% idéntica, 96% idéntica, 97% idéntica, 98% idéntica, 99% idéntica o 100% idéntica al elemento de referencia (por ejemplo, una secuencia biológica).

[00122] Las siguientes abreviaturas se usan en toda la divulgación: conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC); relación de fármaco a anticuerpo (DAR); región de marco (FWR); región determinante de complementariedad (CDR); auristatina F (AuF); región variable pesada (VH); región variable liviana (VL); variable kappa (Vκ); región constante gamma (Cγ); región constante kappa (Cκ); anticuerpo monoclonal (mAb); lisina en la posición de aminoácido 447 de la cadena pesada de la inmunoglobulina, numerada usando el sistema de numeración EU (Lys447).

Generación de inmunoglobulinas conjugadas

[00123] En la presente se describen métodos para generar una inmunoglobulina conjugada, que comprenden: incubar una inmunoglobulina con una transglutaminasa microbiana y un agente funcional que comprende un sustrato donante de acilo, a) donde la inmunoglobulina comprende al menos un residuo de aminoácido después de una Lisina C-terminal, b) donde el sustrato

donante de acilo comprende un residuo glutamina, y c) donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, donde la transglutaminasa microbiana conjuga la Lisina C-terminal de la inmunoglobulina con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo en el agente funcional, generando de esa manera la inmunoglobulina conjugada.

[00124] Además en la presente se describen métodos para generar una inmunoglobulina conjugada, que comprenden: i) incubar una inmunoglobulina con una transglutaminasa microbiana y un sustrato donante de acilo, a) donde la inmunoglobulina comprende al menos un residuo de aminoácido después de una Lisina C-terminal, b) donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina y un grupo reactivo, donde la transglutaminasa microbiana conjuga la Lisina C-terminal de la inmunoglobulina con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo, y ii) conjugar un agente funcional al grupo reactivo del sustrato donante de acilo, donde el agente funcional es un agente terapéutico o un agente de de diagnóstico, generando de ese modo la inmunoglobulina conjugada.

[00125] La conjugación puede realizarse por disolución de un agente funcional que comprende un sustrato donante de acilo en una solución de disolución e incubación del agente funcional disuelto con la inmunoglobulina y la transglutaminasa microbiana en una de conjugación. También es posible realizar la conjugación disolviendo un sustrato donante de acilo en una solución de disolución e incubando el sustrato donante de acilo con la inmunoglobulina y la transglutaminasa microbiana en una solución amortiguadora de conjugación.

[00126] Para agentes funcionales no solubles en agua y sustratos donante de acilo, las soluciones de disolución apropiadas incluyen solventes

orgánicos miscibles en agua tales como dimetilsulfóxido (DMSO). Para agentes funcionales solubles en agua y sustratos donantes de acilo, las soluciones de disolución apropiadas incluyen, no taxativamente, agua o soluciones acuosas amortiguadas, tal como una solución salina amortiguada con fosfato, pH 7.2 (1 x PBS) o DPBS.

[00127] Las concentraciones apropiadas del agente funcional o del sustrato donante de acilo incluyen entre aproximadamente 10 μM y aproximadamente 800 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 40 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 55 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 70 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 90 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 75 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 60 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 40 mM, o entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 30 mM.

[00128] En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 10 μM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 25 μM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 50 μM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 100 μM. En algunas formas de

realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 250 μM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 500 μM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 750 μM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 20 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 30 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 40 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 50 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 60 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 70 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 80 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser

de aproximadamente 90 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 100 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 150 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 200 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 250 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 300 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 350 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 400 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 450 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 500 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 550 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 600 mM. En algunas formas de realización, la concentración del agente funcional o del sustrato donante de acilo puede ser de aproximadamente 650 mM. En algunas formas de realización, la

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

[00129] Las concentraciones apropiadas de inmunoglobulina incluyen entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, entre aproximadamente 0,5 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 12 mg/ml, entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml, o entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 2 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 0,1 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 0,5 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 1 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 2 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 5 mg/ml. En algunas formas de realización, la

concentración de inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 10 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 15 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de inmunoglobulina puede ser de aproximadamente 20 mg/ml.

[00130] Las proporciones adecuadas de un agente funcional o de un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina incluyen entre aproximadamente 1:1 y 100:1. En una forma de realización, la proporción de agente funcional a sustrato donante de acilo:inmunoglobulina es de entre aproximadamente 25:1 y aproximadamente 75:1. En otra forma de realización, la proporción de agente funcional a sustrato donante de acilo:inmunoglobulina es de entre aproximadamente 40:1 y aproximadamente 60:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 1:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 2:1. En algunas formas de realización, la relación entre agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 3:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 4:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 5:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 6:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 7:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de

acilo:inmunoglobulina puede ser 8:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 9:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 10:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 11:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 12:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 13:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 14:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 15:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 16:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 17:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 18:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 19:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 20:1.En algunas formas de realización, la

proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 25:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 30:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 35:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 40:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 45:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 50:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 60:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 70:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 80:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 90:1. En algunas formas de realización, la proporción de un agente funcional o un sustrato donante de acilo:inmunoglobulina puede ser 100:1.

[00131] La incubación puede realizarse en una cantidad de soluciones amortiguadoras de conjugación apropiadas que incluyen, por ejemplo, DPBS, 1xPBS, pH 7.2, fosfato de sodio, fosfato de potasio, borato de sodio, Tris, y

HEPES, para nombrar sólo algunas. La concentración de solución amortiguadora de conjugación incluyen entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 2 M, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 1 M, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 30 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 45 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 60 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 75 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 90 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 75 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 60 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 45 mM, o entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 30 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 20 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 30 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 40 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 50 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 60 mM. En algunas formas de realización, la

concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 70 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 80 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 90 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 100 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 250 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 500 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 750 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 1 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 1,25 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 1,5 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 1,75 M. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 2 M.

[00132] La solución amortiguadora de conjugación puede incluir además cloruro de sodio. Las concentraciones apropiadas de cloruro de sodio incluyen entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 2 M, entre

aproximadamente 0 mM y aproximadamente 1 M, entre aproximadamente 1 M y aproximadamente 2 M, entre aproximadamente 500 mM y aproximadamente 1,5 M, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 75 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 150 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 200 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 250 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 300 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 350 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 400 mM y aproximadamente 500 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 400 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 350 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 300 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 250 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 50 mM, o entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 25 mM. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 25 mM. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 50 mM. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 75 mM. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 100 mM. En algunas formas de realización, la

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

[00133] El pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser entre aproximadamente 4 y aproximadamente 9. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 8. En otra forma de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7. En algunas formas de realización, el

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

aproximadamente 7,5. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,6. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,7. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,8. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 7,9. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 8,0. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 8.1. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 8,2. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 8,3. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 8.4. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 8,5. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de conjugación puede ser de aproximadamente 9.

[00134] A fin de facilitar la funcionalidad de un agente funcional o un sustrato donante de acilo en la solución amortiguadora de conjugación , una concentración final de solvente orgánico miscible en agua en la solución amortiguadora de conjugación puede ser de entre aproximadamente 0% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 2% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 5% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 8% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 11% y aproximadamente

20%, entre aproximadamente 16% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 18%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 15%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 12%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 10%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 8%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 6%, o entre aproximadamente 0% y aproximadamente 2%.

[00135] La solución amortiguadora de conjugación puede comprender además propilenglicol para facilitar la solubilidad del compuesto tiol-reactivo en la solución amortiguadora de conjugación. La concentraciones apropiadas de propilenglicol incluyen entre aproximadamente 1% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 30% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 40% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 40%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 20%. En algunas formas de realización, la concentración de propilenglicol puede ser de aproximadamente 1% o aproximadamente 5%. En algunas formas de realización, la concentración de propilenglicol puede ser de aproximadamente 10%. En algunas formas de realización, la concentración de propilenglicol puede ser de aproximadamente 20%. En algunas formas de realización, la concentración de propilenglicol puede ser de aproximadamente 30%. En algunas formas de realización, la concentración de propilenglicol puede ser de aproximadamente 40%. En algunas formas de realización, la concentración de propilenglicol puede ser de aproximadamente 50%.

[00136] La solución amortiguadora de conjugación puede comprender

además un detergente no iónico para facilitar la solubilidad de la inmunoglobulina conjugada en la solución amortiguadora de conjugación. Los detergentes no iónicos ejemplificativos incluyen no taxativamente polisorbato-20 o polisorbato-80. Las concentraciones apropiadas de detergente no iónico incluyen entre aproximadamente 0% y aproximadamente 1%, entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 1%, entre aproximadamente 0,3% y aproximadamente 1%, entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 1%, entre aproximadamente 0,7% y aproximadamente 1%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 0,8%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 0,6%, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 0,4%, o entre aproximadamente 0% y aproximadamente 0,2%. En algunas formas de realización, la concentración de detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,1%. En algunas formas de realización, la concentración de detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,2%. En algunas formas de realización, la concentración de detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,3%. En algunas formas de realización, la concentración de detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,4%. En algunas formas de realización, la concentración de detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,5%. En algunas formas de realización, la concentración de detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,6%. En algunas formas de realización, la concentración de detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,7%. En algunas formas de realización, la concentración de detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,8%. En algunas formas de realización, la concentración de detergente no iónico puede ser de aproximadamente 0,9%. En algunas formas de realización, la concentración de

detergente no iónico puede ser de aproximadamente 1,0%.

[00137] La incubación puede realizarse durante entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 30 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 36 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 42 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 42 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 36 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 30 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 18 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 12 horas, aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 1 hora, aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas, o entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 6 horas. En algunas formas de realización, la incubación puede realizarse durante aproximadamente 30 minutos. En algunas formas de realización, la incubación puede realizarse durante aproximadamente 1 hora. En algunas formas de realización, la incubación puede realizarse durante aproximadamente 1,5 horas. En algunas formas de realización, la incubación puede realizarse durante 2 horas. En algunas formas de realización, la incubación puede realizarse durante 6 horas. En algunas formas de realización, la incubación puede realizarse durante 12 horas. En algunas formas de

realización, la incubación puede realizarse durante 18 horas. En algunas formas de realización, la incubación puede realizarse durante 24 horas. En algunas formas de realización, la incubación puede realizarse durante 30 horas. En algunas formas de realización, la incubación puede realizarse durante 36 horas. En algunas formas de realización, la incubación puede realizarse durante 42 horas. En algunas formas de realización, la incubación puede realizarse durante 48 horas.

[0138] La temperatura de la incubación puede estar entre aproximadamente 4ºC y aproximadamente 50ºC, entre aproximadamente 18ºC y aproximadamente 37ºC, entre aproximadamente 20ºC y aproximadamente 37ºC, entre aproximadamente 22ºC y aproximadamente 37ºC, entre aproximadamente 24ºC y aproximadamente 37ºC, entre aproximadamente 26ºC y aproximadamente 37ºC, entre aproximadamente 28ºC y aproximadamente 37ºC, entre aproximadamente 30ºC y aproximadamente 37ºC, entre aproximadamente 32ºC y aproximadamente 37ºC, entre aproximadamente 34ºC y aproximadamente 37ºC, entre aproximadamente 18ºC y aproximadamente 34ºC, entre aproximadamente 18ºC y aproximadamente 32ºC, entre aproximadamente 18ºC y aproximadamente 30ºC, entre aproximadamente 18ºC y aproximadamente 28ºC, entre aproximadamente 18ºC y aproximadamente 26ºC, o entre aproximadamente 18ºC y aproximadamente 24ºC. En algunas formas de realización, la incubación se puede realizar a 4ºC. En algunas formas de realización, la incubación se puede realizar a 18ºC. En algunas formas de realización, la incubación se puede realizar a 20ºC. En algunas formas de realización, la incubación se puede realizar a 22ºC. En algunas formas de realización, la

incubación se puede realizar a 24ºC. En algunas formas de realización, la incubación se puede realizar a 26ºC. En algunas formas de realización, la incubación se puede realizar a 28ºC. En algunas formas de realización, la incubación se puede realizar a 30ºC. En algunas formas de realización, la incubación se puede realizar a 32ºC. En algunas formas de realización, la incubación se puede realizar a 34ºC. En algunas formas de realización, la incubación se puede realizar a 37ºC.En algunas formas de realización, la incubación se puede realizar a 50ºC.

[0139] Es posible separar un sustrato donante de acilo o agente funcional no incorporado de la inmunoglobulina conjugada mediante una cromatografía de desalado usando una cantidad de resinas apropiadas que incluyen no taxativamente la resina G-25, resina G-50, Biogel P10, u otras resinas con rangos de límites de exclusión de 5,000-10,000 Da. La cromatografía puede ser realizada en formato de columna o en formato de columna spin, de acuerdo con la escala. Las soluciones amortiguadoras apropiadas para el desalado incluyen, por ejemplo, DPBS, 1xPBS, fosfato de sodio, fosfato de potasio, borato de sodio, Tris, o basadas en HEPES se pueden sustituir por 1x PBS.

[0140] En una primera forma de realización, el agente funcional comprende un sustrato donante de acilo el cual comprende un residuo glutamina conjugado a la Lisina C-terminal a través del sustrato donante de acilo. En esta primera forma de realización, el agente funcional se combina con el sustrato donante de acilo antes de la conjugación con la inmunoglobulina por reacción del grupo reactivo en el sustrato donante de acilo con el agente funcional. En una segunda forma de realización, el sustrato donante de acilo

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

[0141] Los sustratos donantes de acilos pueden comprender un conector, “L”. Los conectores pueden ser conectores no clivables o conectores clivables. Los conectores ejemplificativos incluyen, por ejemplo, conectores que contienen disulfuro, conectores basados en acetal y conectores basados en cetal. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector no clivable. Los conectores no clivables apropiados incluyen, no taxativamente, uno o más aminoácidos, polietilenglicol (PEG) o un alquilo. En algunas formas de realización, el conector puede comprender PEG. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector clivable. Los conectores clivables apropiados incluyen, por ejemplo, valina-citrulina-para aminobencilo. En algunos aspectos, el conector puede ser a conector que contiene disulfuro. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector en base a acetal. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector con base cetal. Un conector puede ser también uno o más aminoácidos, solos o combinados con otro conector tal como uno o más grupos PEG.

[0142] El sustrato donante de acilo que comprende un residuo glutamina puede estar presente en parte o unido a un agente funcional. Los agentes funcionales apropiados incluyen, por ejemplo, floríferos, colorantes fluorescentes, polipéptidos, inmunoglobulinas, antibióticos, ácidos nucleicos, radionúclidos, conectores químicos, moléculas pequeñas, quelantes, lípidos, ácidos nucleicos (tales como AND o ARN) y fármacos. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un fluoróforo. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un colorante fluorescente. En algunos

aspectos, el agente funcional puede comprender un polipéptido. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender una inmunoglobulina. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un antibiótico. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un ácido nucleico (tal como un AND o ARN). En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender a radionúclido. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender una molécula pequeña. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un quelante (por ejemplo, DOTA, CHX-A”-DTPA, NOTA, entre otros). En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un lípido. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un fármaco. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender una combinación de cualquiera de los agentes funcionales mencionados anteriormente.

[0143] El sustrato donante de acilo (*es decir, un primer* sustrato donante de acilo) puede estar unido a un segundo sustrato donante de acilo o a un conector, estando el segundo sustrato donante de acilo o conector unido a una segunda inmunoglobulina que tiene una segunda región variable de cadena pesada y una segunda región variable de cadena liviana, teniendo la segunda región variable de cadena pesada una Lisina C-terminal, donde la Lisina C-terminal tiene al menos un residuo de aminoácido después de la lisina. Por ejemplo, el primer sustrato donante de acilo y el segundo sustrato donante de acilo pueden tener un primer y segundo conector químico como primer y segundo agentes funcionales respectivamente. Los primero y segundo conectores químicos pueden estar unidos entre sí por una cantidad de medios apropiados que incluyen, por ejemplo, la química click.

[0144] En una forma de realización, el agente funcional comprende un

sustrato donante de acilo de acuerdo con una de las fórmulas (I) o (II):

$(Z)_m$-Gln-$(L)_n$-(Y) (I)

(Y)-$(L)_n$-Gln-$(Z)_m$ (II)

donde

Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido; Gln es un residuo del aminoácido glutamina; cada L es independientemente un conector lineal o ramificado de entre 1 y 20 átomos de carbono, donde uno o más de los átomos de carbono pueden ser reemplazados opcional e independientemente por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y donde cada átomo de carbono y nitrógeno puede ser sustituido opcionalmente; o cada L es opcional e independientemente un residuo de aminoácido; m es un entero entre 0 y 5; n es un entero entre 0 y 5; e Y es un agente funcional.

[0145] En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es de acuerdo con una de las fórmulas (III) o (IV):

$(Z)_m$-Gln-$(L)_n$-(X) (III)

(X)-$(L)_n$-Gln-$(Z)_m$ (IV)

donde

Z es un grupo carboxilbenciloxi (CBZ) o un residuo de aminoácido; Gln es un residuo de aminoácido glutamina; cada L es independientemente un conector lineal o ramificado de entre 1 y 20 átomos de carbono, donde uno o más de los átomos de carbono puede reemplazarse opcional e independientemente por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y donde cada átomo de carbono y nitrógeno puede sustituirse opcionalmente; o cada L es opcional e independientemente un residuo de aminoácido; m es un entero entre 0 y 5;n es un entero entre 0 y 5; y X es un grupo reactivo.

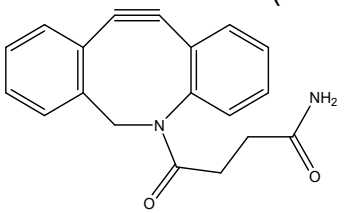
[0146] En una forma de realización, Z es un grupo CBZ. En otra forma de realización, Z es un residuo de aminoácido.

[0147] En una forma de realización, L es un residuo de aminoácido. En una forma de realización, n es 2-5, y cada L es independientemente un residuo de aminoácido. En otra forma de realización, L es un conector lineal o ramificado de entre 1 y 20 átomos de carbono, donde uno o más de los átomos de carbono puede reemplazarse opcional e independientemente por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y donde cada átomo de carbono y nitrógeno puede ser sustituido opcionalmente. En otra forma de realización, L es una unidad polietilenglicol (PEG). En otra forma de realización, n es 2-5, y uno o más L comprenden uno o más aminoácidos y uno o más grupos L adicionales comprenden una unidad polietilenglicol (PEG).

[0148] En una forma de realización, m es 0. En otra forma de realización, m es 1. En otra forma de realización, m es 2. En otra forma de realización, m es 3. En otra forma de realización, m es 4. En otra forma de realización, m es 5.

[0149] En una forma de realización, n es 0. En otra forma de realización, n es 1. En otra forma de realización, n es 2. En otra forma de realización, n es 3. En otra forma de realización, n es 4. En otra forma de realización, n es 5.

[0150] En una forma de realización, X es (1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetanol (BCN). En otra forma de realización, X es



(DBCO). En otra forma de realización, X es trans-

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

[0151] En una forma de realización, para un sustrato donante de acilo de acuerdo con la fórmula (I), Z es un grupo CBZ; Lis una unidad polietilenglicol (PEG) (-O((CH_2)$_2$)-), etilamina (-NH((CH_2)$_2$)-) o propilamina (-NH((CH_2)$_3$)-); y n es 0, 1, 2 o 3.

[0152] En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), donde Z es un grupo CBZ , y L es un aminoácido. En una forma de realización, L es Gly. En un aspecto de esta forma de realización, m es 1, y n es 1.

[0153] En una forma de realización, el sustrato donante de acilo es de acuerdo con la formula (II), donde Z es un grupo CBZ ; m es 1; n es 1, 2 o 3; y al menos un L es Gly.

[0154] En una forma de realización, para un sustrato donante de acilo de acuerdo con la formula (III), Z es un grupo CBZ ; L es una unidad polietilenglicol(PEG) (-O((CH_2)$_2$)-), etil amina (-NH((CH_2)$_2$)-) o propilamina (-NH((CH_2)$_3$)-); y n es 0, 1, 2 o 3.

[0155] En otra forma de realización, el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), donde Z es un grupo CBZ , y L es un aminoácido. En una forma de realización, L es Gly. En un aspecto de esta forma de realización, m es 1, y n es 1.

[0156] En una forma de realización, el sustrato donante de acilo es

acorde con la fórmula (IV), donde Z es un grupo CBZ ; m es 1; n es 1, 2 o 3; y al menos un L es Gly.

[0157] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene entre 1 y 20 residuos de aminoácidos agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, donde 1 residuo de aminoácido se agrega después de la Lisina C-terminal, el residuo de aminoácido agregado adyacente a la Lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) se selecciona entre el grupo formado por glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina, y histidina. En una forma de realización, cuando se agrega 1 residuo de aminoácido después de la Lisina C-terminal, el residuo de aminoácido agregado adyacente a la Lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) no es prolina, ácido aspártico, o ácido glutámico. En una forma de realización, donde 1 residuo de aminoácido se agrega después de la Lisina C-terminal, el residuo de aminoácido agregado adyacente a la Lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) no es lisina o arginina.

[0158] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 2 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1 y +2) añadidos después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 3 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, y +3) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 4 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, y +4) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 5 residuos de aminoácidos

(posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4 y +5) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 6 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, y +6) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 7 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, y +7) agregados después de la Lisina C-terminal *por ejemplo,* (Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 8 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, y +8) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 9 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, y +9) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 10 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, y +10) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 11 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, y +11) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 12 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, y +12) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 13 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, y +13) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 14

residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, y +14) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 15 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, y +15) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 16 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, y +16) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 17 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, y +17) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 18 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, y +18) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 19 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, +18, y +19) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene 20 residuos de aminoácidos (posiciones de aminoácidos +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, +18, +19, y +20) agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447).

[0159] En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene menos de 9 residuos de aminoácidos agregados después de la Lisina C-terminal (*por*

ejemplo, Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina tiene menos de 13 residuos de aminoácidos agregados después de la Lisina C-terminal (*por ejemplo,* Lys447). En una forma de realización, la inmunoglobulina no tiene la secuencia: GTYFQAYGT (SEQ ID N°: 1), GECTYFQAYGCTE (SEQ ID N°: 2) o GENTYFQAYGNTE (SEQ ID N°: 3) agregada después de la Lisina C-terminal *por ejemplo,* Lys447).

[0160] En una forma de realización, donde se agregan dos o más residuos de aminoácidos o están presentes después de la Lisina C-terminal, el último residuo de aminoácido agregado o presente después de la Lisina C-terminal (*es decir, el* residuo de aminoácido más alejado de la Lisina C-terminal) se selecciona entre el grupo formado por fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano, y glicina. En una forma de realización, donde se agregan dos o más residuos de aminoácidos o están presentes después de la Lisina C-terminal, el último residuo de aminoácido agregado o presente después de la Lisina C-terminal no es lisina o arginina.

[0161] Los métodos descriptos pueden realizarse en una inmunoglobulina humanizada. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina humanizada.

[0162] Los métodos descriptos pueden realizarse en una inmunoglobulina humana. Como consecuencia, en algunas formas de realización, la inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina humana. En otra forma de realización, la inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina no humana.

[0163] En una forma de realización, los métodos descriptos pueden realizarse en una inmunoglobulina IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4. En una forma de realización, el método se realiza en una inmunoglobulina IgG_1. En una forma de realización, el método se realiza en una inmunoglobulina IgG_2.En una forma de realización, el método se realiza en una inmunoglobulina IgG_3. En una forma de realización, el método se realiza en una inmunoglobulina IgG_4.

[0164] En una forma de realización, los métodos descriptos pueden realizarse en IgA_1, IgA_2, o IgM. En una forma de realización, el método se realiza en una inmunoglobulina IgA_1. En una forma de realización, el método se realiza en una inmunoglobulina IgA_2.En una forma de realización, el método se realiza en una inmunoglobulina IgM. En una forma de realización, la inmunoglobulina IgA o IgM tiene una pieza de cola. En otra forma de realización, la inmunoglobulina IgA o IgM tiene la pieza de cola eliminada.

[0165] En una forma de realización, el método se realiza en una inmunoglobulina IgD o IgE inmunoglobulina. En una forma de realización, el método se realiza en una inmunoglobulina IgD inmunoglobulina. En una forma de realización, el método se realiza en una inmunoglobulina IgE inmunoglobulina.

[0166] Para los métodos que aquí se describen, en una forma de realización, la transglutaminasa microbiana es de esporas de *Actinomadura* sp. T–2, *Bacillus circulans* BL32, esporas *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterobacter* sp. C2361, *Providencia* sp. C1112, *Streptoverticillium mobaraense* (aka *Streptomyces mobarensis*), *Streptomyces platensis*M5218, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces lividans*JT46/pAE053, *Streptomyces*

lydicus, *Streptomyces platensis*, *Streptomyces sioyansis*, *Streptoverticillium griseocarneum*, *Streptoverticillium ladakanum* NRRL–3191, *Streptoverticillium* sp. s–8112, o *Streptococcus suis*. En una forma de realización, la transglutaminasa microbiana es de *Streptomyces mobarensis*.

[0167] Para los métodos que aquí se describen, en una forma de realización, la transglutaminasa se aísla de una planta seleccionada entre el grupo formado por *Medicago sativa, Beta vulgaris, Helianthus tuberosus, Zea mays, Glycine max, Arabidopsis thaliana, Nicotiana tabacum, Chlamydom onas reinhardtii, Dunaliella salina, Oryza sativa,* y *Rosmarinus officinalis* L.

[0168] Para los métodos que aquí se describen, en una forma de realización, la transglutaminasa es de mamífero y se aísla de la Transglutaminasa 1 a 7 y Factor XIII.

[0169] En una forma de realización, la transglutaminasa es al menos 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a una transglutaminasa microbiana que se describe en la presente. En una forma de realización, la transglutaminasa es al menos 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la transglutaminasa microbiana de *Streptomyces mobarensis*. Las enzimas transglutaminasa pueden ser adquiridas en Ajinomoto® o Zedira (Número de producto T001). En otra forma de realización, la transglutaminasa está purificada. En otra forma de realización, la transglutaminasa se expresa de manera recombinante y a continuación se purifica usando métodos conocidos en la técnica.

[0170] En una forma de realización, la enzima transglutaminasa está

presente en los métodos que aquí se describen en una concentración de entre aproximadamente 0,1 unidades/ml y aproximadamente 250 unidades/ml. En una forma de realización, la enzima transglutaminasa está presente en los métodos que aquí se describen en una concentración de entre aproximadamente 1 unidad/ml y aproximadamente 25 unidades/ml. En una forma de realización, la enzima transglutaminasa está presente en los métodos que aquí se describen en una concentración de entre aproximadamente 1 unidad/ml y aproximadamente 25 unidades/ml. En una forma de realización, la enzima transglutaminasa está presente en los métodos que aquí se describen en una concentración de aproximadamente 0,1 unidad/ml. En una forma de realización, la enzima transglutaminasa está presente en los métodos que aquí se describen en una concentración de aproximadamente 0,5 unidad/ml. En una forma de realización, la enzima transglutaminasa está presente en los métodos que aquí se describen en una concentración de aproximadamente 1 unidad/ml. En una forma de realización, la enzima transglutaminasa está presente en los métodos que aquí se describen en una concentración de aproximadamente 5 unidades/ml. En una forma de realización, la enzima transglutaminasa está presente en los métodos que aquí se describen en una concentración de aproximadamente 10 unidades/ml. En una forma de realización, la enzima transglutaminasa está presente en los métodos que aquí se describen en una concentración de aproximadamente 15 unidades/ml. En una forma de realización, la enzima transglutaminasa está presente en los métodos que aquí se describen en una concentración de aproximadamente 20 unidades/ml. En una forma de realización, la enzima transglutaminasa está presente en los métodos que aquí se describen en una concentración de aproximadamente 25

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

[0171] Para los métodos que se proveen aquí, en una forma de realización, la proporción de agente funcional a inmunoglobulina se encuentra entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 2:1. En una forma de realización, la proporción de agente funcional a inmunoglobulina es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 2:1. En una forma de realización, la proporción de agente funcional a inmunoglobulina es de aproximadamente 1:1. En una forma de realización, la proporción de agente funcional a inmunoglobulina es de aproximadamente 2:1. En una forma de realización, se conoce la proporción de agente funcional a inmunoglobulina y puede ser reproducida sistemáticamente siguiendo los métodos que se describen en la presente. La proporción de agente funcional a inmunoglobulina, tal como se usa en la presente, se calcula en base a un promedio de la proporción de conjugación entre el agente funcional y una inmunoglobulina en un grupo de anticuerpos en una composición.

[0172] En algunas formas de realización provistas en la presente,

cuando al menos dos residuos de aminoácidos adicionales están presentes después de la Lisina C-terminal, y cuando uno de los al menos dos residuos de aminoácidos adicionales comprende una lisina, la proporción de agente funcional a inmunoglobulina se incrementa en base a la cantidad de residuos de aminoácidos adicionales que son lisina. Por ejemplo, cuando están presentes dos residuos de aminoácidos adicionales después de una Lisina C-terminal, y uno de los residuos de aminoácidos adicionales también es una lisina, hay dos residuos de lisina presentes, resultando en un anticuerpo con cuatro sitios de transamidación y una proporción entre agente funcional a inmunoglobulina de aproximadamente 2:1 y aproximadamente 4:1. En otro ejemplo, donde están presentes cinco residuos de aminoácidos adicionales después de una Lisina C-terminal, y dos de los residuos de aminoácidos adicionales son lisinas, están presentes tres (total) residuos de lisina, resultando en un anticuerpo con seis sitios de transamidación y una relación de agente funcional a inmunoglobulina de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 6:1.

Inmunoglobulinas conjugadas

[00173] En la presente también se divulgan inmunoglobulinas conjugadas que comprenden cualquiera de las inmunoglobulinas divulgadas en la presente, en donde la lisina en la posición C-terminal (por ejemplo, la lisina en la posición 447, o “Lys447”) tiene por lo menos un residuo de aminoácido adicional después de la lisina C-terminal, y se conjuga con un agente funcional que comprende un sustrato donante de acilo, en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina. Formas de realización adicional incluyen inmunoglobulinas conjugadas que comprenden cualquiera de las

inmunoglobulinas divulgadas en la presente, en donde la lisina en la posición C-terminal (por ejemplo, la lisina en la posición 447, o “Lys447”) presenta por lo menos un residuo de aminoácido adicional después de dicha lisina C-terminal, y se conjuga con un sustrato donante de acilo, en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina y un grupo reactivo, en donde el grupo reactivo se puede hacer reaccionar con un agente funcional después de la conjugación del sustrato donante de acilo con la inmunoglobulina.

[00174] En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina o histidina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende glicina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende alanina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende valina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende leucina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende isoleucina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende metionina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende fenilalanina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende

tirosina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende triptofano. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende serina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende treonina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende cisteína. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende asparagina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende glutamina. En una forma de realización, el residuo de aminoácido adyacente a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) comprende histidina. En una forma de realización, en donde se agrega 1 residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal, dicho residuo de aminoácido adyacente agregado a la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) no es prolina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina o arginina.

[00175] En otra forma de realización, si se agrega más de un aminoácido a la lisina C-terminal, el último aminoácido adicional (es decir, el aminoácido ubicado en el extremo C-terminal de los residuos de aminoácidos agregados) puede ser cualquier aminoácido, excepto lisina o arginina. Por ejemplo, cuando se agregan dos residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal, la secuencia comprende un primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) y un segundo aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +2), en donde el primer

residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1) es cualquier residuo de aminoácido excepto ácido aspártico, ácido glutámico o prolina, y en donde el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +2) se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina. En una forma de realización, el primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal es lisina o arginina. En otra forma de realización, el segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +2) no es lisina o arginina.

[00176] A modo de otro ejemplo, cuando se agregan cinco residuos de aminoácidos después de una lisina C-terminal (posiciones de aminoácido +1, +2, +3, +4 y +5), la secuencia comprende un primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +1), un segundo residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +2), un tercer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +3), un cuarto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +4) y un quinto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +5). El primer residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto ácido aspártico, ácido glutámico o prolina. El segundo, tercer y cuarto residuos de aminoácidos después de la lisina C-terminal puede ser cualquier aminoácido. Sin embargo, el quinto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +5) se selecciona del

grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, prolina, treonina, alanina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptofano y glicina. En otra forma de realización, el quinto residuo de aminoácido después de la lisina C-terminal (posición de aminoácido +5) no es lisina o arginina. En otra forma de realización, el primer, segundo, tercer o cuarto residuos de aminoácido (posiciones de aminoácido +1, +2, +3 y/o +4) después de la lisina C-terminal pueden ser, cada uno, lisina o arginina.

[00177] En algunas formas de realización, la inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina humanizada. En otras formas de realización, la inmunoglobulina es humana. En otra forma de realización, la inmunoglobulina es quimérica.

[00178] El sustrato donante de acilo que comprende un residuo glutamina y un grupo reactivo también puede comprender un conector, “L”. Asimismo, los agentes funcionales que contienen un sustrato donante de acilo que comprende un residuo glutamina puede tener un conector entre el agente funcional y la porción del sustrato donante de acilo de la molécula. Los conectores pueden ser conectores no clivables o conectores clivables. Los ejemplos de conectores incluyen, por ejemplo, conectores que contienen disulfuro, conectores basados en acetal y conectores basados en cetal. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector no clivable. Los conectores no clivables adecuados incluyen, pero en un sentido no taxativo, polietilenglicol (PEG) o un alquilo. En algunas formas de realización, el conector puede comprender PEG. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector clivable. Los conectores clivables adecuados incluyen, por

ejemplo, valina-citrulina-para-aminobencilo. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector que contiene disulfuro. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector basado en acetal. En algunos aspectos, el conector puede ser un conector basado en cetal.

[00179] Las inmunoglobulinas conjugadas de la invención comprenden un agente funcional. Los agentes funcionales adecuados incluyen, por ejemplo, un agente terapéutico o un agente de diagnóstico. Los agentes funcionales adecuados incluyen, por ejemplo, fluoróforos, colorantes fluorescentes, polipéptidos, inmunoglobulinas, antibióticos, ácidos nucleicos, radionúclidos, conectores químicos, moléculas pequeñas, quelantes, lípidos y fármacos. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un fluoróforo. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un colorante fluorescente. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un polipéptido. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender una inmunoglobulina. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un antibiótico. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un ácido nucleico (tal como ADN o ARN). En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un radionúclido. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender una molécula pequeña. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un quelantes (por ejemplo, DOTA, CHX-A”-DTPA, NOTA, entre otros). En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un lípido. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender un fármaco. En algunos aspectos, el agente funcional puede comprender una combinación de cualquiera de los agentes funcionales enumerados precedentemente.

[00180] Por lo tanto, las inmunoglobulinas conjugadas divulgadas incluyen, pero en un sentido no taxativo, conjugados de inmunoglobulina-fluoróforo lisina C-terminal, conjugados de inmunoglobulina-colorante fluorescente lisina C-terminal, conjugados de inmunoglobulina-polipéptido lisina C-terminal, conjugados de inmunoglobulina-inmunoglobulina lisina C-terminal, conjugados de inmunoglobulina-antibióticos lisina C-terminal, conjugados de inmunoglobulina-ácido nucleico lisina C-terminal, conjugados de inmunoglobulina-radionúclido lisina C-terminal, conjugados de inmunoglobulina-conector químico lisina C-terminal, conjugados de inmunoglobulina-molécula pequeña lisina C-terminal, conjugados de inmunoglobulina-quelante de lisina C-terminal, conjugados de inmunoglobulina-lípido lisina C-terminal y conjugados de inmunoglobulina-fármaco lisina C-terminal.

[00181] Cualquiera de las inmunoglobulinas divulgadas en la presente se puede conjugar con cualquiera de los agentes funcionales divulgados en la presente. Por ejemplo, la inmunoglobulina conjugada puede comprender un fluoróforo, colorante fluorescente, polipéptido, inmunoglobulina, antibiótico, ácido nucleico, radionúclido, conector químico, molécula pequeña, quelante, lípido o fármaco.

[00182] En algunas formas de realización, la inmunoglobulina se puede conjugar con un agente antineoplásico de molécula pequeña, tal como una auristatina. En algunos aspectos, el agente funcional puede ser la auristatina F (AuF). Por lo tanto, las inmunoglobulinas conjugadas divulgadas incluyen cualquiera de las inmunoglobulinas divulgadas precedentemente conjugadas con la auristatina F (conjugado AuF Lys447).

Composiciones farmacéuticas

[00183] En la presente también se proveen composiciones farmacéuticas. En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas pueden comprender cualquiera de las inmunoglobulinas divulgadas en la presente. En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas pueden comprender cualquiera de las inmunoglobulinas conjugadas que se divulgan en la presente. En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende la inmunoglobulina conjugada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

[00184] En la presente también se proveen moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las inmunoglobulinas divulgadas en la presente. A modo de ejemplo, en una forma de realización, la molécula de ácido nucleico codifica una inmunoglobulina que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena liviana, donde la región variable de la cadena liviana tiene una lisina en la posición C-terminal (por ejemplo, la posición 447 o “Lys447”) y uno o más aminoácidos después de la lisina C-terminal seleccionados entre glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina e histidina.

[00185] También se divulgan células huésped que comprenden cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos divulgadas. Las células huésped adecuadas incluyen, pero en un sentido no taxativo, células de mamífero, células bacterianas, células de levadura, células de insecto, por nombrar unos pocos.

[00186] Los siguientes ejemplos se proveen a fin de describir algunas de las formas de realización que se divulgan en la presente. Los ejemplos pretenden ilustrar, y no limitar, las formas de realización divulgadas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Mutagénesis

[0121] Las mutaciones se generaron usando QuikChange XL de Stratagene de acuerdo con el protocolo del proveedor. Las mutaciones deseadas se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

Transfección y generación de líneas celulares estables

[0122] Por cada mililitro de células a transfectar con ExpiFectamina, se incubaron 333,3 ng de plásmido HC y 333,3 ng de plásmido LC durante 5-10 min en 50 µl de Opti-MEM (ThermoFisher). Asimismo, se incubaron 2,67 µl de ExpiFectamina en 50 µl de Opti-MEM. La solución de ExpiFectamina se agregó a la mezcla de ADN y se incubó durante 20-30 min a temperatura ambiente. Se agregó una mezcla de ADN:ExpiFectamina a las células bajo agitación suave y se incubaron a 37 °C, con 8% de CO_2, agitación a 125 rpm. Al día siguiente, se agregaron 5 µl de potenciador 1 y 50 µl de potenciador 2 por ml de células a la transfección continuándose con la incubación por otros 7-10 días.

[0123] Se seleccionaron las agrupaciones estables que expresan el anticuerpo mediante adición de 1 ml de transfectantes a 14 ml de DMEM en un recipiente T75 con blasticidina 5 µg/ml y zeocina 400 µg/ml (Invivogen) uno a tres días después de la transfección. Después que las células resistentes al fármaco habían crecido hasta confluencia, se reemplazó el medio por medio de

expresión FreeStyle 293 durante 24 a 48 h. Las células se desprendieron físicamente golpeando el frasco (la tripsinización dio como resultado una baja viabilidad, no se muestran los datos) y luego se sembraron a razón de $6x10^5$ células/ml en 30 ml de medio de expresión FreeStyle 293 en un frasco de agitación de 125 ml. Los cultivos se incubaron a 37 °C en 8% de CO_2 con agitación a 125 rpm.

Producción de MAb

[0124] Las agrupaciones de líneas celulares transfectadas de manera estable se sembraron a razón de 0,6 a $1x10^6$ células/ml en medio de expresión FreeStyle 293. Las células se incubaron a 37 °C, 8% de CO_2, agitación a 125 rpm. Dos días después que el cultivo alcanzó una densidad de 1 x 10^6 células/ml, los cultivos se alimentaron con concentraciones finales de Select Soytone (BD Biosciences) 10 g/l, ácido valérico 5 mM (Sigma Aldrich) y concentrado de lípidos CD 1:100 (ThermoFisher). Cuando la viabilidad celular era menor que un 50% (7-10 días), los cultivos se centrifugaron durante 1 h a 8000 rpm en un rotor Beckman JLA8.1000. Luego se filtró el sobrenadante a través de un filtro PES de 0,2 µm y se guardó a 4 °C o -20 °C hasta su purificación.

Purificación de MAb

[0125] Los MAbs se purificaron usando uno de dos métodos. Para sobrenadantes de mAb de menos de 10 ml, se empleó cromatografía de afinidad usando un método de purificación por lotes con una resina de proteína A. Los sobrenadantes de MAb de más de 25 ml se purificaron usando columnas de proteína A preempaquetadas.

Purificación por lotes

[0126] Se equilibró una resina de Proteína A de gran capacidad Prosep-vA (Millipore) con DPBS, y se agregaron 100 µl a entre 3 y 6 ml de muestra. Después de una incubación a 4 °C por entre 1 hora y toda la noche, la resina se lavó tres veces con 1 ml de DPBS y se centrifugó a 18.000 x *g* durante 30 s. La muestra se eluyó de la resina mediante adición de 400 µl de glicina 0,1 M, pH 2,9, seguido por centrifugación a 18.000 x *g* durante 30 s. La muestra se neutralizó con 40 µl de Tris 1 M, pH 8,0. La solución amortiguadora se intercambió usando 0,5 ml de filtros de corte 10k Amicon Ultra (Millipore) mediante concentración de la muestra hasta ~ 100 µl por centrifugación a 18.000 x *g* durante 3 a 5 minutos. La muestra concentrada se diluyó en 400 µl de DPBS, seguido por centrifugación. El proceso se repitió por un total de cuatro veces.

Purificación de la columna

[0127] Se equilibró una columna de proteína A (GE Healthcare) con 10 volúmenes de columna (CV) de fosfato de sodio 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7,2. Luego se cargó la muestra, seguido por lavado del material no unido con 10 CV de solución amortiguadora de equilibrio. La muestra se eluyó usando 5 CV de glicina 0,1 M, pH 2,9. Se agruparon las fracciones que contienen los mAb y se dializaron en DPBS usando un equipo MWCO 20K Slide-A-Lyzer (ThermoFisher).

Síntesis del sustrato Z-Gln-Gly

[0128] El sustrato Z-Gln-Gly-OH se obtuvo de Bachem y el sustrato Z-Gln-Gly-CAD-biotina se obtuvo de Zedira (Figura 2).

[0129] La síntesis del éster de Z-Gln-Gly-pentafluorofenilo (Z-Gln-Gly-PFP) era de Pasternack *et al.,* {Pasternack, 1997 15 /id}, con modificaciones

(Figura 3). Se disolvieron Z-Gln-Gly-OH (328,8 mg, 0,975 mmol) y pentafluorofenol (Sigma, 183,3 mg, 0,996 mmol) en 10 ml de *N,N'*-dimetilformamida (DMF). Luego se agregó EDAC-HCl (Sigma, 201 mg, 1,04 mmol) y la reacción se incubó a temperatura ambiente bajo N_2 durante 2 h. Se agregaron 100 ml de éter dietílico frío a la reacción y se precipitó durante la noche a -80 °C. El producto crudo se recolectó mediante centrifugación y se recristalizó a partir de 20 ml de metanol a 60 °C. El producto final se lavó con éter dietílico frío y se secó sobre un flujo de N_2. El rendimiento final era de 219,04 mg (44,7%). ESI-MS (infusión directa en 50% de acetonitrilo en 0,1% de ácido fórmico) m/z 504,0 ([M+H], 86%), 526,0 ([M+Na], 100%), 542,0 ([M+K], 22%).

Z-Gln-Gly-propilazida (Z-Gln-Gly-N_3)

[0130] Se disolvieron Z-Gln-Gly-PFP (21,24 mg, 4,22 x 10^{-5} mol) y azidopropilamina (Click Chemistry Tools, 42,2 µl de una solución madre 0,91 M en DMF, 3,84 x 10^{-5} mol) en 0,42 ml de volumen final de DMF. La reacción se agitó bajo N2 durante la noche a temperatura ambiente. El producto se purificó mediante HPLC usando 0,1% de ácido fórmico en H_2O/0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo como fase móvil. El producto se secó *in vacuo*. El rendimiento final era de 10,7 mg (60,4%). ESI-MS (purificación en gradiente) m/z 420,2 ([M+H], 100%), 442,1 ([M+Na], 32%).

Z-Gln-Gly-PEG_3-*endo*-biciclononino (Z-Gln-Gly-PEG_3-BCN)

[0131] Se disolvieron Z-Gln-Gly-PFP (18,4 mg, 3,66 x 10^{-5} mol) y *endo*-biciclo[6,1,0]non-4-in-9-il-PEG_3-amina (Conju-Probe, 175 µl de una solución madre 0,27 M en DMF, 4,75 x 10^{-5} mol) en 0,37 ml de volumen final de DMF. La reacción se agitó bajo N_2 durante la noche a temperatura ambiente.

El producto se purificó mediante HPLC usando 0,1% de ácido fórmico en H_2O/0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo como fase móvil. El producto se secó *in vacuo*. El rendimiento final era de 0,6 mg (2%). ESI-MS (purificación en gradiente) m/z 688,2 ([M+H], 100%), 710,2 ([M+Na], 69%).

Z-Gln-Gly-PEG_2-auristatina F (Z-Gln-Gly-PEG_2-AuF)

[0132] Se disolvió Z-Gln-Gly-PFP (22,2 mg, 4,37 x 10^{-5} mol) en 0,85 ml de DMF y se agregó 1,2-etilendiamina (2,3 x 10^{-5} l, 3,5 x 10^{-4} mol) y se mezcló. La reacción se agitó bajo N_2 durante la noche a temperatura ambiente. El producto se purificó mediante HPLC usando 0,1% de ácido fórmico en H_2O/0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo como fase móvil. El producto se secó *in vacuo*. El rendimiento final de Z-Gln-Gly-NH_2 era de 3,8 mg (23%). ESI-MS (purificación en gradiente) m/z 380,1 ([M+H], 100%). Se disolvieron Z-Gln-Gly-NH2 (3,8 mg, 1,01 x 10^{-5} mol) y NHS-PEG_2-AuF (10,3 mg, 1,03 x 10^{-5}mol) en 0,2 ml de DMF. Se agregó trietilamina (14 µl, 1 x 10^{-4} mol) y la reacción se incubó bajo N_2 durante la noche a temperatura ambiente. La mitad de la reacción se purificó mediante HPLC usando 0,1% de ácido fórmico en H_2O/0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo como fase móvil. El producto se secó *in vacuo*. El rendimiento final de CBZ-Gln-Gly-PEG_2-AuF era de 3,8 mg (60%). ESI-MS (purificación en gradiente) m/z 634,0 ($[M+H]^{2+}$, 100%), 645,1 ($[M+Na]^{2+}$, 45%). 1267,0 ([M+H], 16%).

Reacción con la transglutaminasa microbiana

[0133] Se incubaron MAbs a un rango de concentraciones de entre 100 µg/ml y 2,5 mg/ml con 785 µM de Z-Gln-Gly-biotina (Zedira), Z-Gln-Gly-N_3, Z-Gln-Gly-BCN o Z-Gln-Gly-PEG_2-AuF con 1 U/ml de transglutaminasa microbiana (Zedira) en DPBS durante al menos 16 h a 37 °C.

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

[0134] Se diluyeron anticuerpos purificados a 1 mg/ml en DPBS (si era inferior a 1,0 mg/ml las muestras se dejaron a la concentración original). Las reacciones que contienen dimetilsulfóxido (DMSO) se desalaron usando una columna de desalado Spin Zeba. Luego los mAbs se deglicosilaron usando PNGasa F (NEB) o bien se digirieron en fragmentos Fab'_2 y Fc mediante IdeS (Promega). Para deglicosilar los mAbs, se agregaron solución amortiguadora G7 (5 ó 10 µl) y PNGasa F (1 ó 2 µl) al mAb (50 ó 100 µl). La reacción se incubó en un microondas Discover (CEM) durante 2 ciclos: 1.) potencia del microondas a 10 W, 37 °C, 10 min, y luego una pausa de 3-5 min; 2.) potencia del microondas a 2 W, 37 °C, 10 min. Se redujo una porción de la muestra deglicosilada mediante adición de ditiotreitol (DTT) a una concentración final de 20 mM, seguido por incubación a 60 °C durante 3 min. Para generar los fragmentos Fab'_2 y Fc, se agregaron 50 U/µl de IdeS a 0,5 mg/ml de mAb y se incubaron a 37 °C durante 0,5-1 h. Las muestras de IdeS no se redujeron excepto por el anticuerpo 01-C que se redujo como se describió antes.

[0135] Luego se analizaron las muestras usando un espectrómetro de masa Waters Acquity UPLC y Q-T de Premier. Las muestras (0,5-2 µg de cada una) se inyectaron en una microcolumna de desalado MassPrep a 65 °C, se eluyeron de la columna con 5 min de equilibrio en 95% de fase móvil A, un gradiente por 10 min (5-90% de B) y nuevo equilibrio por 10 min en 95% de fase móvil A, a 0,05 ml/min. La fase móvil A era 0,1% de ácido fórmico en agua. La fase móvil B era 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo El espectrómetro de masa Q-Tof se corrió en la modalidad V, ion positivo, con

detección en el rango de 500-4000 m/z. Los parámetros de la fuente fueron: voltaje capilar, 2,25 kV (anticuerpo intacto)-2,50 kV (anticuerpo reducido); voltaje del cono de muestreo, 65,0 V (anticuerpo intacto) o 50,0 V (anticuerpo reducido); temperatura de la fuente, 100 °C; temperatura de desolvatación, 250 °C; flujo gaseoso de desolvatación, 550 l/h. El pico de proteína se desarrolló usando la función MassLynx MaxEnt 1.

Cromatografía líquida de fase reversa (LC)-MS

[0136] El anticuerpo 01-L (1 mg/ml) se incubó durante la noche con un exceso molar 50X de Z-Gln-Gly-PEG_2-AuF en la presencia de 1 U/ml de TGasa a 37 °C. El mAb se digirió en fragmentos Fab'_2 y Fc con IdeS y se redujo con DTT igual que antes. La muestra se analizó usando HPLC Waters Alliance con detectores SQD y PDA. La muestra (0,5-2 µg) se inyectó en una columna Proteomix RP-1000 (4,6 X 50 mm, Sepax) a 65 °C. La separación de los fragmentos LC, Fc y Fd se realizó con equilibrio por 1,5 minutos en 75% de fase móvil A (0,1% de TFA en agua) y un gradiente de 13,5 minutos [25-65% de fase móvil B (0,1% de TFA en acetonitrilo)] a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

[0137] El espectrómetro de masa SQD se corrió en la modalidad V, ion positivo, con detección en el rango de 200-2.000 m/z. Los parámetros de la fuente fueron: voltaje capilar, 3,00kV; voltaje del cono de muestreo, 40 °C; temperatura de la fuente, 120 °C; temperatura de desolvatación, 250 °C; flujo gaseoso de desolvatación, 800 l/h. Tiempo de barrido, 1 segundo. El pico de proteína se desarrolló mediante la función MassLynx MaxEnt 1. El detector PDA se encontraba a 280 nm.

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

IgG

[0138] Se examinaron las estructuras cristalinas de un Fab IgG1-kappa (anticuerpo 01, 4F3F), un Fab IgG1-lambda (4HK0) y Fc IgG1 (1FC1) por sitios aceptores de acilo potenciales. Dado que la transglutaminasa microbiana tiende a preferir las glutaminas y lisinas del sustrato expuestas al solvente dentro de bucles {Spolaore, 2012 17 /id}, se resaltaron las lisinas expuestas al solvente usando Discovery Studio v4.5 con un radio de sonda de 1,4 Å (Figura 4). Hay 7 lisinas expuestas al solvente en el anticuerpo 01 VH con 3 en bucles. Ya que la cantidad de lisinas puede variar entre mAbs debido a la utilización de diferentes familias de regiones variables e hipermutación somática, también se analizó la exposición al solvente de las lisinas en la región VH de otros cinco anticuerpos basado en posiciones análogas de los residuos en la estructura 4F3F. Estas regiones VH contienen potencialmente 1-5 lisinas expuestas al solvente con 1 ó 2 presentes en un bucle. En el anticuerpo 01 Vκ hay 6 lisinas expuestas al solvente y 4 se encuentran en bucles. Las regiones VK de otros cuatro anticuerpos contienen potencialmente 3-5 lisinas expuestas al solvente con 2 en un bucle. El anticuerpo 05 utiliza una cadena lambda, y la exposición al solvente de la lisinas se determinó usando la estructura cristalina de 4HK0 basado en la similitud de secuencia de la cadena liviana. El anticuerpo 05 tiene potencialmente 2 lisinas expuestas al solvente en el dominio Vλ y solamente 1 en un bucle.

[0139] Se analizaron los dominios constantes de CH1 y kappa, Fc y lambda usando las estructuras cristalinas de 4F3F, 1FC1 y 4HK0, respectivamente. Los dominios constantes de la IgG_1 tienen 23 lisinas expuestas al solvente con 13 en bucles. La región constante kappa tiene 8

lisinas con 5 en un bucle. La región lambda tiene 6 lisinas expuestas al solvente con la mitad en bucles. En total, los anticuerpos analizados presentaron un rango entre 42 y 50 lisinas expuestas al solvente en bucles por mAb.

[0140] Para determinar si la transglutaminasa microbiana puede transamidar un residuo lisina nativo sobre un anticuerpo IgG, se incubaron anticuerpos con un exceso molar 50X de Z-Gln-Gly-CAD-biotina y 1 U/ml de transglutaminasa microbiana a 37 °C durante la noche. Las muestras se digirieron con IdeS y se redujeron con DTT, y las masas de los fragmentos LC, Fd y Fc se analizaron mediante espectrometría de masa. Las muestras no se deglicosilaron, y se observaron dos picos de masa correspondientes a las glicoformas G0F (+1445 Da) y G1F (+1608 Da) por cada Fc. El anticuerpo 04 también contiene un sitio de glicosilación N-ligado en VH y se observaron dos especies de glicano, G2FS y G2FS2. Todas las muestras carecían de una lisina C-terminal (128 Da), como lo demuestra la diferencia de -130 a -132 Da entre la masa observada y la masa teórica para el Fc. Aunque hay 42-50 potenciales lisinas aceptoras de acilo en los diferentes anticuerpos, ni HC o LC fueron modificados por el sustrato donante de acilo (Figura 6, Tabla 1).

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

ZQG-CAD-biotina: +631 Da

	LC			Fd				Fc			
	% calculado	Observado	ΔMasa	% calculado	Observado	Glicano	ΔMasa	% calculado	Glicano	Observado	ΔMasa
Anticuerpo 02	23751	23750	-1	25073	25071		-2	25328	G0F	25198	-130
								25491	G1F	25360	-131
Anticuerpo 03	23478	23478	0	26097	26097		0	25388	G0F	25258	-130

								25551	G1F	25420	-131
Anticuerpo 01	23216	23213	-3	25072	25069		-3	25328	G0F	25198	-130
								25491	G1F	25359	-132
Anticuerpo 04	23532	23530	-2	27566	27564	G2FS	-2	25296	G0F	25166	-130
				27857	27855	G2FS2	-2	25459	G1F	25327	-132
Anticuerpo 05	22655	22653	-2	26340	26337		-3	25328	G0F	25198	-130
								25491	G1F	25360	-131
Anticuerpo 06	23472	23470	-2	25383	25381		-2	25328	G0F	25198	-130
								25491	G1F	25359	-132

Tabla 1: Las masas de los LC, Fd y Fc se determinaron mediante ESI-MS como se muestra en la Figura 6. La masa teórica de cada fragmento se determinó mediante la secuencia de aminoácidos restada de la masa observada para determinar el cambio en la masa (Δmasa). Un Δmasa de -128 Da se debe al clivaje de Lys447. El Fc está glicosilado con uno o dos oligosacáridos, G0F o G1F.

[0141] También se analizaron dos controles positivos generados, que contienen un péptido con dos sitios aceptores de acilo de lisina conocidos (GGSTKHKIPGGS (SEQ ID Nº: 6); {Takazawa, 2004 23 /id} fusionados genéticamente al extremo C terminal del anticuerpo 01 HC o LC (HC-KTag o LC-KTag, respectivamente). Los mAbs KTag se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una transglutaminasa microbiana. Las muestras se desglicosilaron mediante PNGasa F y se redujeron con DTT. Las masas de las cadenas pesada y liviana se analizaron mediante espectrometría de masa. El mAb LC-KTag se modificó con hasta dos moléculas de Z-Gln-Gly-CAD-biotina, consistente con la modificación de las dos lisinas en KTag (Figura 7, Tabla 2).

Tabla 2: Transamidación de un K-Tag C-terminal

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

LC	% calculado	Observado	ΔMasa	Nº de biotinas	% conjugado
Anticuerpo 01	23216	23216	0	0	0,0%
HC-KTag	23216	23216	0	0	0,0%
LC-KTag	24323	24953	630	1,00	19,0%
	24323	25584	1261	2,00	81,0%

HC	% calculado	Observado	ΔMasa	Nº de biotinas	% conjugado
Anticuerpo 01	48937	48810	-127	0	0,0%
HC-KTag	50044	50671	627	0,99	18,7%
	50044	51306	1262	2,00	42,6%
	50044	51938	1894	3,00	38,6%
LC-KTag	48809	48811	2	0	0,0%

[0142] Las masas de HC y LC se determinaron mediante ESI-MS como se muestra en la Figura 7. La masa teórica de cada fragmento se determinó mediante la secuencia de aminoácidos restada de la masa observada para determinar el cambio en la masa (Δmasa). Una Δmasa de -128 Da se debe al clivaje de Lys447 y una Δmasa de +631 Da indica la adición de una molécula de Z-Gln-Gly-CAD-biotina. El número de moléculas de Z-Gln-Gly-CAD-biotina conjugadas sobre HC o LC se determinó dividiendo el cambio en la masa por la masa de Z-Gln-Gly-CAD-biotina. El porcentaje de conjugación se determinó dividiendo la intensidad de la señal de un solo pico de HC o LC por la suma de las intensidades de todos los picos de HC o LC en la muestra.

[0143] La adición de KTag a la HC sorprendentemente dio como resultado la adición de no solo dos, sino hasta tres moléculas de Z-Gln-Gly-CAD-biotina a la HC. Como solamente hay dos lisinas en KTag, una lisina en el mAb era el tercer sitio aceptor de acilo. Dada la proximidad de KTag, el sitio aceptor en la lisina del mAb más probable era la Lys447 de la cadena pesada.

Ejemplo 3: La extensión de un solo aminoácido es suficiente para la

transamidación de Lys447

[0144] La Lys447 típicamente es clivada por la carboxipeptidasa B durante la expresión de la IgG recombinante en células HEK293 y CHO {Harris, 1990 7 /id; Harris, 1995 6 /id; Dick, 2008 3 /id}. Sin embargo, la adición de KTag al extremo C-terminal de HC bloquea la eliminación de Lys447 permitiendo así que la transglutaminasa microbiana utiliza la Lys447 como un sitio aceptor de acilo. Para determinar si la transglutaminasa microbiana podría utilizar la Lys447 como un aceptor de acilo sin KTag, se bloqueó el clivaje de Lys447 mediante la adición de una o dos leucinas por el extremo C-terminal del anticuerpo 01 (anticuerpo 01-HC-L o anticuerpo 01-HC-LL, respectivamente). Los mAbs purificados se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una transglutaminasa microbiana y se analizó la masa de la HC deglicosilada. Aún más, la adición de una o dos leucinas retuvo a Lys447, y la HC se modificó con un solo sustrato donante de acilo consistente con la transamidación de Lys447 (Figura 8; Tabla 3).

Tabla 3: Transamidación del anticuerpo 01 con una leucina C-terminal

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

	C-terminal	% calculado	Observado	ΔMasa	% conjugado
Anticuerpo 01	...SPGK	48937	48803	-134	0,0%
Anticuerpo 01-HC-L	...SPGK-L	49050	49674	624	100,0%
Anticuerpo 01-HC-LL	...SPGK-LL	49164	49788	624	100,0%

[0145] Las masas de HC y LC se determinaron mediante ESI-MS El porcentaje de conjugación de Z-Gln-Gly-CAD-biotina (Δmasa=631 Da) con un mAb se determinó como en la Tabla 3.

[0146] Se agregó una leucina C-terminal a otros dos mAbs. Los mAbs de tipo salvaje y mutante se incubaron con una transglutaminasa microbiana y Z-Gln-Gly-CAD-biotina durante la noche a 37 °C. El fragmento Fc de cada

muestra se analizó mediante espectrometría de masa igual que antes. Al igual que con el anticuerpo 01, la adición de una leucina C-terminal dio como resultado la transamidación del mAb mutante, pero del tipo salvaje (Tabla 4).

Tabla 4: Transamidación de anticuerpos monoclonales con una leucina C-terminal

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

	C-terminal	Glicano	% calculado	Observado	ΔMasa	% conjugado
Anticuerpo 10	...SPGK	25346	1445	25218	-128	0,0%
		25509	1608	25379	-130	
Anticuerpo 11	...SPGK-L	25441	1445	26071	630	100,0%
		25604	1608	26233	629	
Anticuerpo 12	...SPGK	25491	1608	25360	-131	0,0%
		25653	1770	25523	-130	
Anticuerpo 13	...SPGK-L	25441	1445	26071	630	100,0%
		25604	1608	26232	628	

Los MAbs se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una transglutaminasa microbiana 37 °C durante la noche, seguido por digestión con IdeS para generar los fragmentos Fab y Fc. Las masas de los fragmentos Fc generados con IdeS se analizaron mediante ESI-MS como en la Figura 6, y se determinó el porcentaje de conjugación con Z-Gln-Gly-CAD-biotina (Δmasa=631 Da) como en la Tabla 2.

[0147] Para determinar si otros aminoácidos podían bloquear el clivaje de Lys447 y si proporcionaban el contexto apropiado para que una transglutaminasa microbiana modificara la Lys447, los aminoácidos remanentes se agregaron como una extensión de un solo residuo al extremo C-terminal. Las muestras se analizaron por la modificación mediante una transglutaminasa microbiana usando Z-Gln-Gly-CAD-biotina. La masa del fragmento Fc se analizó mediante espectrometría de masa igual que antes. No resultó sorprendente que una lisina o arginina C-terminal adicional no protegía

el clivaje de Lys447, ya que son sustratos para la carboxipeptidasa B (Tabla 5). Entre los aminoácidos remanentes, solamente una prolina C-terminal y residuos ácidos no facilitaban un 100% de conjugación con el sustrato. Además de un cambio promedio de +628 Da asociado con la conjugación con Z-Gln-Gly-CAD-biotina (+631 Da), también se observó un cambio de masa de +400 Da. Esto probablemente se deba a un pequeño porcentaje de Z-Gln-Gly-CAD ya sea debido a la síntesis de Z-Gln-Gly-CAD-biotina o a la degradación de esta última.

Tabla 5: Efecto de los aminoácidos C-terminales sobre la transamidación de Lys447

Z-Gln-Gly-CAD: +404 Da
Z-Gln-Gly-CAD-biotina: +631 Da

C-terminal	Glicano	% calculado	Observado	ΔMasa	Porcentaje	Total conjugado
...SPGK	G0F	25328	25197	-131	55,1%	0,0%
	G1F	25491	25360	-131	44,9%	
...SPGK-G	G0F	25385	26013	628	31,4%	100,0%
	G0F	25385	25785	400	20,2%	
	G1F	25548	26175	627	26,9%	
	G1F	25548	25954	406	21,6%	
...SPGK-A	G0F	25399	26027	628	44,3%	100,0%
	G0F	25399	25800	401	13,2%	
	G1F	25562	26189	627	42,5%	
...SPGK-V	G0F	25427	26055	628	46,2%	100,0%
	G0F	25427	25827	400	15,6%	
	G1F	25590	26217	627	38,2%	
...SPGK-L	G0F	25441	26069	628	64,1%	100,0%
	G0F	25441	25841	400	10,6%	
	G1F	25604	26231	627	25,3%	
...SPGK-I	G0F	25441	26069	628	46,4%	100,0%
	G0F	25441	25841	400	15,4%	
	G1F	25604	26232	628	38,1%	
...SPGK-M	G0F	25459	26087	628	44,3%	100,0%
	G0F	25459	25858	399	13,9%	
	G1F	25622	26249	627	41,8%	
...SPGK-P	G0F	25425	25422	-3	36,7%	37,2%
	G1F	25588	25584	-4	26,1%	
	G0F	25425	26053	628	20,1%	
	G1F	25588	26216	628	17,0%	
...SPGK-F	G0F	25475	26103	628	48,1%	100,0%
	G0F	25475	25875	400	15,5%	
	G1F	25638	26265	627	36,4%	

...SPGK-Y	G0F	25491	26120	629	50,3%	100,0%
	G0F	25491	25892	401	14,5%	
	G1F	25654	26281	627	35,1%	
...SPGK-W	G0F	25514	26142	628	49,4%	100,0%
	G0F	25514	25915	401	11,5%	
	G1F	25677	26304	627	39,2%	
...SPGK-S	G0F	25415	26044	629	47,6%	100,0%
	G0F	25415	25815	400	14,2%	
	G1F	25578	26205	627	38,2%	
...SPGK-T	G0F	25429	26057	628	47,4%	100,0%
	G0F	25429	25829	400	12,8%	
	G1F	25592	26219	627	39,8%	
...SPGK-C	G0F	25431	25431	0	8,4%	91,6%
	G0F	25431	26062	631	75,1%	
	G1F	25594	26224	630	16,5%	
...SPGK-N	G0F	25442	26070	628	41,2%	100,0%
	G0F	25442	25842	400	16,6%	
	G1F	25605	26232	627	42,2%	
...SPGK-Q	G0F	25456	26084	628	56,3%	100,0%
	G0F	25456	25856	400	8,7%	
	G1F	25619	26246	627	35,0%	
...SPGK-D	G0F	25443	25441	-2	42,3%	24,0%
	G1F	25606	25603	-3	33,7%	
	G0F	25443	26072	629	12,1%	
	G1F	25606	26233	627	11,9%	
...SPGK-E	G0F	25457	25455	-2	28,0%	34,7%
	G1F	25620	25617	-3	37,3%	
	G0F	25457	26085	628	20,3%	
	G1F	25620	26248	628	14,4%	
...SPGK-H	G0F	25465	26094	629	49,2%	100,0%
	G0F	25465	25865	400	11,6%	
	G1F	25628	26256	628	39,1%	
...SPGK-K	G0F	25456	25197	-259	50,6%	0,0%
	G1F	25619	25359	-260	49,4%	
...SPGK-R	G0F	25465	25197	-268	53,6%	0,0%
	G1F	25628	25359	-269	46,4%	

Los MAbs se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una transglutaminasa microbiana 37 °C durante la noche, seguido por digestión con IdeS para generar los fragmentos Fab y Fc. Las masas de los fragmentos Fc generados con IdeS se analizaron mediante ESI-MS como en la Figura 6 (no se muestran los datos), y se determinó el porcentaje de conjugación con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y Z-Gln-Gly-CAD (Δmasa=631 Da y 404 Da, respectivamente) como en la Tabla 2.

[0148] Debido al clivaje de la adición de un solo aminoácido de lisina o arginina C-terminal, no se pudo evaluar el efecto de ninguno de los aminoácidos sobre la transamidación de la Lys447. Por ello, se agregó una leucina al extremo C-terminal de las variantes de lisina y arginina. Además, también se investigó el efecto de una leucina C-terminal adicional con las variantes de prolina, aspartato y glutamato. La leucina adicional tuvo un efecto positivo sobre la transamidación de todas las variantes C-terminales evaluadas (Tabla 6). Con el bloqueo del clivaje de la lisina o arginina, la Lys447 estaba un 100% transamidada. Además, la lisina adicional en la variante KL también se transamidó, dando un anticuerpo con 4 sitios de transamidación. La leucina C-terminal también aumentó la transamidación de la variante de prolina a un 61,3%, y las variantes de residuos ácidos eran moderadamente transamidadas (Tabla 6).

Tabla 6: Efecto de dos aminoácidos C-terminales sobre la transamidación de Lys447

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

C-terminal	Glicano	% calculado	Observado	ΔMasa	Porcentaje	Total conjugado
...SPGK-L	G0F	25441	26072	631	77,3%	100,0%
	G1F	25604	26235	631	22,7%	
...SPGK-KL	G0F	25569	26831	1262	62,0%	100,0%
	G0F	25732	26993	1261	38,0%	
...SPGK-RL	G1F	25597	26229	632	57,5%	100,0%
	G1F	25760	26391	631	42,5%	
...SPGK-PL	G0F	25538	25538	0	25,0%	61,3%
	G0F	25701	25701	0	13,8%	
	G1F	25538	26169	631	29,1%	
	G1F	25701	26332	631	32,2%	
...SPGK-DL	G0F	25556	25556	0	47,8%	24,0%
	G0F	25719	25719	0	28,2%	
	G1F	25556	26187	631	11,5%	
	G1F	25719	26349	630	12,5%	
...SPGK-EL	G0F	25570	25570	0	40,6%	28,6%
	G0F	25733	25733	0	30,7%	
	G1F	25570	26203	633	14,0%	

Tabla 6: Los MAbs se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una

transglutaminasa microbiana 37 °C durante la noche, seguido por digestión con IdeS para generar los fragmentos Fab y Fc. Las masas de los fragmentos Fc generados con IdeS se analizaron mediante ESI-MS como en la Figura 6 (no se muestran los datos), y se determinó el porcentaje de conjugación con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y Z-Gln-Gly-CAD (Δmasa=631 Da y 404 Da, respectivamente) como en la Tabla 2.

Ejemplo 4: Transamidación de la lisina C-terminal de varios isotipos de anticuerpo

[0149] El residuo C-terminal de CH3 (o CH4 en los casos de las IgE e IgM) es una lisina en todos los isotipos humanos (Tabla 7). Por ello, es posible que esta lisina se podría utilizar como un sitio de conjugación sobre otros isotipos. Las versiones IgG_2, IgG_3 e IgG_4 del anticuerpo 01 se elaboraron con o sin una leucina o aspartato C-terminal adicional. Los mAbs se incubaron con una transglutaminasa microbiana y Z-Gln-Gly-CAD-biotina durante la noche a 37 °C y las masas de los fragmentos Fc se analizaron mediante espectrometría de masa igual que antes. A igual que con la IgG_1, se eliminaron las lisinas C-terminales durante la expresión en células HEK293 a menos que hubiera un residuo C-terminal adicional (Tabla 8). No se observó transamidación con de las IgG_2, IgG_3 o IgG_4 de tipo salvaje o con un aspartato C-terminal, pero una leucina C-terminal facilitó la transamidación de los mAbs.

Tabla 7: Alineamiento de los codones C-terminales de CH3 o CH4 de diferentes isotipos humanos

IgG1	...LSLSPGK*
IgG2	...LSLSPGK*
IgG_3	...LSLSPGK*
IgG4	...LSLSLGK*
IgA_1y_2	...IDRLAGKPTH...
IgD	...VSVNPGK*

IgE ...TDHGPMK*
IgM ...VDKSTGKPTL...

Se alinearon los codones C-terminales de CH3 (CH4 en el caso de IgE e IgM). Los tres codones N-terminales de la porción de cola de IgA e IgM están incluidos.

Tabla 8: Transamidación de IgG_2, IgG_3 e IgG_4 con una leucina C-terminal

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

	C-terminal	Glicano	% calculado	Observado	ΔMasa	% conjugado
IgG2	...SPGK	G0F	25362	25232	-130	0,0%
		G1F	25525	25394	-131	
IgG_2-L	...SPGK-L	G0F	25475	26104	629	100,0%
		G1F	25638	26266	628	
IgG_2-D	...SPGK-D	G0F	25477	25475	-2	23,2%
		G1F	25640	25637	-3	
		G0F	25477	26106	629	
		G1F	25640	26268	628	
IgG_3	...SPGK	G0F	25396	25266	-130	0,0%
		G1F	25559	25428	-131	
IgG_3-L	...SPGK-L	G0F	25509	26138	629	100,0%
		G1F	25672	26300	628	
IgG_3-D	...SPGK-D	G0F	25511	25509	-2	24,7%
		G1F	25674	25671	-3	
		G0F	25511	26140	629	
		G1F	25674	26302	628	
IgG_4	...SPGK	G0F	25344	25214	-130	0,0%
		G1F	25507	25376	-131	
IgG_4-L	...SLGK-L	G0F	25457	25455	-2	81,9%
		G1F	25620	25616	-4	
		G0F	25457	26086	629	
		G1F	25620	26248	628	
IgG_4-D	...SPGK-D	G0F	25459	25457	-2	16,8%
		G1F	25622	25619	-3	
		G0F	25459	26087	628	
		G1F	25622	26250	628	

Los MAbs se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una transglutaminasa microbiana 37 °C durante la noche, seguido por digestión con IdeS para generar los fragmentos Fab y Fc. Las masas de los fragmentos Fc generados con IdeS se analizaron mediante ESI-MS como en la Figura 6 (no se muestran los datos), y se determinó el porcentaje de conjugación con Z-Gln-

Gly-CAD-biotina (Δmasa=631 Da) como en la Tabla 2.

Ejemplo 5: Sustratos donantes de acilo

[0150] Una utilidad de las conjugaciones con la lisina C-terminal es en la elaboración de ADC específicos del sitio. La conjugación de agentes funcionales con la lisina C-terminal se podría efectuar mediante uno de dos métodos. Primero, un método de 2 pasos requeriría la conjugación mediante una transglutaminasa microbiana de la lisina C-terminal con un donante de acilo sintetizado con un grupo reactivo, tal como BCN, DBCO, TCO, azido (N_3), alquino, tetrazina o maleimida. El segundo paso comprendería la conjugación de un agente funcional al grupo reactivo usando, por ejemplo, una química click sin cobre o una química tiol reactiva. Por ello, se agregó amino-PEG3-BCN o aminopropil-N_3 al grupo hidroxilo de Z-Gln-Gly como se describió en la sección de Métodos. El anticuerpo 01-HC-L se incubó con Z-Gln-Gly, Z-Gln-Gly-CAD-biotina, Z-Gln-Gly-N_3 o Z-Gln-Gly-PEG3-BCN y una transglutaminasa microbiana al igual que antes. Las muestras se desalaron, deglicosilaron, redujeron y analizaron mediante ESI-MS para determinar la adición del sustrato al mAb. Los cuatro sustratos se conjugaron eficazmente al anticuerpo 01-HC-L (Tabla 9).

Tabla 9: Conjugación de varios grupos funcionales sobre Lys447

	Da	% calculado	Observado	ΔMasa	Porcentaje
Z-Gln-Gly-N_3	+402	49050	49048	-2	9,2%
		49050	49447	397	90,8%
Z-Gln-Gly-PEG_3-BCN	+670	49050	49717	667	100,0%
Z-Gln-Gly	+320	49050	49047	-3	1,9%
		49050	49367	317	98,1%
Z-Gln-Gly-CAD-biotina	+631	49050	49047	-3	22,8%
		49050	49677	627	77,2%

Los MAbs se incubaron con Z-Gln-Gly-CAD-biotina y una transglutaminasa microbiana 37 °C durante la noche, seguido por digestión con

IdeS para generar los fragmentos Fab y Fc. Las masas de los fragmentos Fc generados con IdeS se analizaron mediante ESI-MS como en la Figura 6 (no se muestran los datos), y se determinó el porcentaje de conjugación con los diversos sustratos como en la Tabla 2.

[0151] Un segundo método comprende un solo paso de conjugación en el cual se sintetiza un agente funcional con un grupo donante de acilo. Este método se evaluó sintetizando un grupo Z-Gln-Gly sobre PEG2-auristatina F (Z-Gln-Gly-PEG2-AuF). El sustrato Z-Gln-Gly-PEG2-AuF se incubó con el anticuerpo 01-L y una transglutaminasa microbiana durante la noche a 37 °C. Después de una digestión con IdeS y reducción con DTT, se monitoreó la absorbancia a 280 nm y se analizó mediante LC-MS de fase reversa. Se observaron tres picos para el anticuerpo 01-L (Figura 9). La masa de cada pico se analizó mediante ESI-MS, y se determinó que el primer pico era LC, el segundo era Fc y el tercero era Fd. Se observó un cuarto pico para el anticuerpo 01-L incubado con Z-Gln-Gly-PEG2-AuF y una transglutaminasa microbiana. Aunque este pico no se pudo separar por completo del pico de Fd, se determinó que el área de la mayor parte de los picos (Figura 9B, inserto) era del 75,4% del área total de los picos de Fc y Fc-Z-Gln-Gly-PEG$_2$-AuF (Tabla 10). Por ello, se logró una DAR mayor que 1,58.

Tabla 10: Conjugación de un solo paso de auristatina F sobre Lys447

	Área pico				
Compuesto	Fc	Fc+compuesto	Total	% de compuesto/Fc	DAR
Z-Gln-Gly-PEG2-AuF	780	2398	3178	75,4	1,5

Los MAbs se incubaron con un sustrato donante de acilos y una

transglutaminasa microbiana a 37 °C durante la noche, seguido por digestión con IdeS y reducción con DTT para generar los fragmentos LC, Fc y Fd. El porcentaje de conjugación se calculó dividiendo el área pido a UV 280 de Fc+compuesto por el área total de los picos de Fc y Fc+compuesto en la Figura 9.

Ejemplo 6: Generación de moléculas de anticuerpo diméricas

[0152] Otra utilidad de la adición de grupos funcionales a la lisina C-terminal de una inmunoglobulina es la generación de moléculas diméricas de mAb-mAb. Por ejemplo, un mAb conjugado con BCN se puede conjugar con un mAb conjugado con N_3 usando la química clic sin cobre. Por lo tanto, se mezclaron volúmenes iguales de las reacciones de Z-Gln-Gly-N3 o Z-Gln-Gly-PEG3-BCN anticuerpo 01-HC-L y se dejaron incubar durante la noche a 22 °C. La reacción reducida se analizó por las HC dimerizadas (~110 kDa) mediante SDS-PAGE usando un gel de bis-Tris poliacrilamida al 4-12% (Figura 10). Aún más, las cadenas pesadas modificadas con BCN y N3 formaron moléculas de cadena pesada diméricas.

[0153] Los especialistas en el arte podrán apreciar que es posible efectuar numerosos cambios y modificaciones en las formas de realización preferidas de la invención y que dichos cambios y modificaciones se pueden realizar sin apartarse del espíritu de la invención. Por ello, se pretende que las reivindicaciones adjuntas abarcan todas dichas variaciones equivalentes que caen dentro del verdadero espíritu y alcance de la invención.