

Señora

Directora de la Dirección de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

E. S. D.

Re.: Expediente **No. NC2018/0013314**

Solicitud de Patente PCT entrada en Fase Nacional, para: “**INMUNGLOBULINAS CONJUGADAS CON LISINA**”.

Solicitantes: **EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

Yo, **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, obrando en mi calidad de apoderada de la sociedad solicitante del asunto citado en la referencia, en atención a su oficio **No. 8941** notificado el 27 de julio de 2020, me permito dar respuesta al mismo de la siguiente manera:

1. Título

De acuerdo con el Examinador el título inicial “INMUNGLOBULINAS CONJUGADAS CON LISINA” no se relaciona con el objeto de la solicitud contenido en la descripción y las reivindicaciones.

Teniendo en cuenta la descripción de la presente solicitud de patente y reivindicaciones se refieren a inmunoglobulinas conjugadas y a métodos para generarlas, se modifica el título de la invención de la siguiente manera: “INMUNOGLOBULINAS CONJUGADAS QUE COMPRENDEN UN RESIDUO LISINA MODIFICADO Y MÉTODOS PARA GENERARLAS”. De modo que, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

2. Modificaciones al capítulo reivindicatorio

Con el fin de superar las objeciones formuladas por excepciones de patentabilidad, título, claridad de las reivindicaciones, se presenta un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 67 reivindicaciones y se pone de presente lo siguiente frente a las objeciones formuladas:

Las reivindicaciones 4-7, 10, 12-30, 32-33, 37, 40, 51-53, 61-64, 72-73, 78-87, 90, 97 y 117 han sido eliminadas en el pliego de reivindicaciones modificado.

Las reivindicaciones 1, 2, 8, 9, 11, 31, 34-36, 38, 39, 41, 42, 45, 46, 50, 59, 60, 65, 91, 92, 95, 96, 98, 99, 102, 103 y 111-116 se modificaron según se indica en la tabla que se muestra a continuación cuyo soporte se encuentra en la memoria descriptiva originalmente presentada y publicada como WO 2017/213267. Veamos:

No. de reivindicación	Naturaleza de la modificación	Sustento de ejemplo
1	Modificada para especificar el residuo lisina modificado. Modificada para especificar que el residuo lisina modificado se encuentra en la región constante de una cadena pesada o liviana de la inmunoglobulina. Modificada para especificar el sustrato donante de acilo	Reivindicación 4 original y página 21, línea 4 de la memoria descriptiva. Párrafo [0015] de la memoria descriptiva. Reivindicación 33 original
2	Modificada para especificar el residuo lisina modificado. Modificada para especificar que el residuo lisina modificado se encuentra en la región constante de una cadena pesada o liviana de la inmunoglobulina. Modificada para especificar el sustrato donante de acilo	Reivindicación 4 original y página 21, línea 4 de la memoria descriptiva. Párrafo [0015] de la memoria descriptiva. Reivindicación 40 original
8	Modificada para que se incluya dentro del alcance de las reivindicaciones 1 y 2 de las cuales depende la reivindicación 8.	
9	Combinada con la reivindicación 10	Reivindicación 10 original
11	Modificada por combinación con las reivindicaciones 12-20 originales.	Reivindicaciones 12-20 originales
31	Modificada por combinación con la reivindicación 32 original	Reivindicación 32 original
34, 35	Modificada para corregir la dependencia	

No. de reivindicación	Naturaleza de la modificación	Sustento de ejemplo
36	Modificada por combinación con la reivindicación 37 original	Reivindicación 37 original
38, 39, 41, 45, 46	Modificada para corregir la dependencia	
50	Modificada por combinación con las reivindicaciones 51-53 originales.	Reivindicaciones 51-53 originales
59	Modificada para especificar el residuo lisina modificado. Modificada para especificar que el residuo lisina modificado se encuentra en la región constante de una cadena pesada o liviana de una inmunoglobulina. Modificada para especificar el sustrato donante de acilo	Reivindicación 61 original y página 21, línea 4 de la memoria descriptiva. Párrafo [0015] de la memoria descriptiva. Reivindicación 33 original
60	Modificada para especificar el residuo lisina modificado. Modificada para especificar que el residuo lisina modificado se encuentra en la región constante de una cadena pesada o liviana de una inmunoglobulina. Modificada para especificar el sustrato donante de acilo	Reivindicación 61 original y página 21, línea 4 de la memoria descriptiva. Párrafo [0015] de la memoria descriptiva tal como se presentó. Reivindicación 33 original
65	Modificada para que se incluya dentro del alcance de las reivindicaciones 59 y 60 de las cuales depende la reivindicación 65.	
92, 95, 96, 98, 99, 102, 103, 111 -116	Modificadas para corregir la dependencia.	

Adicionalmente, conforme a las sugerencias del examinador de unir las reivindicaciones dependientes para reducir el número excesivamente grande de reivindicaciones dependientes, se pone de presente que el solicitante combinó varias reivindicaciones dependientes en el nuevo pliego reivindicatorio y en consecuencia, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

Con respecto a la claridad de las reivindicaciones

De acuerdo con el Examinador, la reivindicación 1 es poco clara porque no menciona las posiciones de los residuos de lisina modificados y/o insertados con base en secuencias de referencia, ni menciona la naturaleza de los agentes funcionales que corresponden a grupos donadores de acilo y dichas condiciones se consideran esenciales para reproducir el método. Mi representada desea poner de presente que no comparte la opinión del Examinador a este respecto más sin embargo, con el interés de acelerar el trámite y sin aceptar el rechazo del examinador, se modifica la reivindicación 1 para especificar la naturaleza del residuo lisina modificado y la naturaleza del sustrato donante de acilo. En particular, se modifica la reivindicación 1 para especificar que el residuo lisina modificado es un residuo de aminoácido natural que ha sido mutado a un residuo lisina, que se selecciona del grupo de sustituciones de aminoácidos específicas en una región constante de la cadena pesada, una región constante kappa de una cadena liviana y una región constante lambda de una cadena liviana de la inmunoglobulina. Asimismo, se modificó esta reivindicación para especificar las características estructurales del sustrato donante de acilo. Por lo tanto, la reivindicación 1 modificada especifica las posiciones de los residuos lisina modificados y la naturaleza de los agentes funcionales que corresponden a los grupos donantes de acilo.

De otro lado, el Examinador menciona que la reivindicación 2 no es clara porque no señala las posiciones de los residuos de lisina modificados y/o insertados con base en secuencias de referencia, ni menciona la naturaleza de los posibles agentes funcionales que se consideran esenciales para reproducir el método; asimismo, no se menciona que, el segundo paso se lleva a cabo mediante química clic sin cobre o, química tiol reactiva. A pesar de no compartir las conclusiones del Examinar, con el interés de acelerar el trámite y sin aceptar el rechazo del examinador, se modifica la reivindicación 2 para especificar el residuo lisina modificado y la naturaleza del sustrato donante de acilo. Específicamente, se modificó la reivindicación 2 para especificar que el residuo lisina modificado es un residuo de aminoácido natural que ha sido mutado a un residuo lisina que se selecciona del grupo de sustituciones de aminoácidos específicos en una región constante de la cadena pesada, una región constante kappa de una cadena liviana y una región constante lambda de una cadena liviana de la inmunoglobulina. Asimismo, se modificó esta reivindicación para especificar las características estructurales del sustrato donante de acilo. Por lo tanto, la reivindicación 2 modificada especifica las posiciones de los residuos lisina modificados y la naturaleza de los agentes funcionales que corresponden a los grupos donantes de acilo.

Con respecto a la naturaleza de la química empleada en el segundo paso del método reivindicado, el solicitante afirma que, como bien surge de la memoria descriptiva, la conjugación de un agente terapéutico o de diagnóstico con el grupo reactivo del sustrato donante de acilo se puede lograr usando cualquier química apropiada. Por ejemplo, como se describe en el párrafo [00126] de la memoria descriptiva tal como se presentó, el término "grupo reactivo" 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. Por lo tanto, a diferencia de lo que opina el examinador, la naturaleza de la reacción química involucrada en el segundo paso del método no resulta esencial para reproducirlo.

Con respecto a las reivindicaciones 4-8 y 11-32, el Examinador afirma que son poco claras porque se refieren a: *mutaciones de residuos nativos a residuos de lisina en una inmunoglobulina o, inserciones en el C-terminal de dicha molécula, sin suministrar alguna secuencia de referencia sobre la cual se encuentran dichas modificaciones, por lo que, es imposible establecer de manera precisa la característica estructural*. Ahora bien, se pone de presente que las reivindicaciones 4-7, 15-16 y 21-30 han sido eliminadas del nuevo pliego reivindicatorio y con respecto a las reivindicaciones 8, 11-14, 17-20 y 31-32, el solicitante señala que estas reivindicaciones en última instancia dependen de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que se refieren a residuos lisina específicos modificados en una región constante de una cadena pesada, región constante kappa de una cadena liviana y región constante lambda de una cadena liviana de la inmunoglobulina. Las secuencias de las regiones constantes de una cadena pesada, cadena kappa liviana y cadena lambda liviana son bien conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Schroeder et al., J Allergy Clin Immunol. 2010, 125 (202): S41- 52). En consecuencia, contrario a la opinión del examinador, se pueden determinar con precisión las características estructurales de las inmunoglobulinas conjugadas que se reivindican y las reivindicaciones 8, 11-14, 17-20 y 31-32 son claras.

Con respecto a las reivindicaciones 5, 15, 21, 22, 23, 24 y 29, el Examinador señala que son poco claras porque mencionan una inserción de un aminoácido “no ácido” o “diferente de prolina”, sin que la solicitud haya explorado todas las posibles estructuras resultantes de la inserción de todos los aminoácidos contemplados en el alcance de la reivindicación. A pesar de no compartir esta objeción, solamente con el interés de acelerar la tramitación de la solicitud y sin que signifique aceptar el rechazo, las reivindicaciones 5, 15, 21, 22, 23, 24 y 29 han sido eliminadas del nuevo pliego reivindicatorio, por lo cual se torna irrelevante la objeción.

Con respecto a las reivindicaciones 59 y 60, el Examinador señala que son poco claras y carecen de sustento en la descripción ya que reclaman una inmunoglobulina conjugada la cual, no se caracteriza a partir de secuencia completa de aminoácidos y su grupo funcional sino que, pretende definirse mediante modificaciones en residuos de lisina que no son tipificadas por su posición con referencia a una secuencia de referencia, así como tampoco, se menciona la posición del residuo de glutamina del agente funcional; además, la solicitud no ha explorado cualquier secuencia de inmunoglobulina que comprenda residuos de lisina modificados. Con respecto las objeciones formuladas a este respecto, el solicitante sostiene que las reivindicaciones se modificaron para especificar el residuo lisina modificado y la naturaleza del sustrato donante de acilo. Concretamente, se modificaron las reivindicaciones 59 y 60 para especificar que el residuo lisina modificado es un residuo de aminoácido natural que ha sido mutado a un residuo lisina que se selecciona del grupo de sustituciones de aminoácidos específicas en una región constante de la cadena pesada, una región constante kappa de una cadena liviana y una región

constante lambda de una cadena liviana de la inmunoglobulina. Asimismo, se especificaron las características estructurales del sustrato donante de acilo. Por lo tanto, contrariamente a la afirmación del examinador, las reivindicaciones 59 y 60 modificadas están definidas por las modificaciones del residuo lisina que se tipifican por su posición con respecto a una secuencia de referencia (por ejemplo, secuencia de la región constante de cadena pesada, región kappa de cadena liviana o región lambda de cadena liviana). Las reivindicaciones 59 y 60, modificadas, también se definen por el sustrato donante de acilo específico de acuerdo con una de las fórmulas (I), (II), (III) y (IV), de modo que las reivindicaciones 59 y 60 modificadas son claras.

Con respecto a las reivindicaciones 61-65 y 68-89, las cuales no son claras de acuerdo con el Examinador por no referirse a secuencias de aminoácidos, lo cual impide establecer de manera precisa la estructura de la molécula reclamada; se pone de presente que las reivindicaciones 61-64, 72-73 y 78-87 han sido eliminadas del nuevo pliego reivindicatorio y que las reivindicaciones 65, 68-71, 74-77 y 87-89 dependen de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, que se refieren a residuos lisina específicos modificados en una región constante de una cadena pesada, región constante kappa de una cadena liviana y región constante lambda de una cadena liviana de la inmunoglobulina. Como se mencionó anteriormente, las secuencias de las regiones constantes de cadena pesada, cadena kappa liviana y cadena lambda liviana son conocidas en el arte. Por lo tanto, contrario a las afirmaciones del examinador, la estructura exacta de la molécula reivindicada se puede determinar fácilmente.

Finalmente, la reivindicación 117 también ha sido eliminada del nuevo pliego reivindicatorio.

Así entonces, con las modificaciones y argumentos arriba señalados a favor de la claridad del nuevo pliego reivindicatorio, es claro que dicho nuevo pliego cumple con las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486 y por lo tanto, las objeciones formuladas a este respecto se deben tener por superadas.

Con respecto a la falta de sustento de las reivindicaciones

De acuerdo con el Examinador:

La descripción no divulga la invención de manera suficientemente completa para que la persona normalmente versada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla (o reproducirla), ya que se reclaman dos métodos para la conjugación de inmunoglobulinas en donde el sitio de conjugación comprende cualquier residuo de lisina; no obstante, las pruebas técnicas muestran que, los métodos reclamados, solo son funcionales cuando se introducen residuos específicos de lisina que se encuentran expuestos al solvente.

Asimismo, se indica lo siguiente con respecto a las reivindicaciones 59 y 60 que *la solicitud no ha explorado cualquier secuencia de inmunoglobulina que comprenda residuos de lisina modificados.*

Con respecto a lo anterior, en primer lugar, el solicitante señala que las reivindicaciones independientes 1, 2, 59 y 60 se modificaron para especificar que el residuo lisina modificado es un residuo de aminoácido natural que ha sido mutado a un residuo lisina que se selecciona del grupo que consiste en: Treonina 135 (T135K), Serina 136 (S136K), Leucina 193 (L193K), Ácido aspártico 221 (D221K), Treonina 223 (T223K), Histidina 224 (H224K), Treonina 225 (T225K), Metionina 252 (M252K), Asparagina 297 (N297K) y Prolina 445 (P445K) en una región constante de una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta; Leucina 201 (L201K) y Serina 202 (S202K) en una región constante kappa de la cadena liviana de la inmunoglobulina, o una parte de unión al antígeno de esta, y ácido glutámico 213 (E213K) en una región constante lambda de la cadena liviana de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, en donde los residuos de aminoácidos se numeran según el sistema de numeración de la UE. Las reivindicaciones 1, 2, 59 y 60 también se modificaron para especificar las características estructurales del sustrato donante de acilo, es decir, que el sustrato donante de acilo es de acuerdo con una de las fórmulas (I), (II), (III) o (IV).

Las reivindicaciones 1, 2, 59 y 60, así como las reivindicaciones dependientes de estas, son totalmente reproducibles y están sustentadas en la memoria descriptiva original. En particular, la memoria descriptiva del solicitante describe y ejemplifica inmunoglobulinas conjugadas que comprenden numerosos residuos lisina modificados, tales como residuos de aminoácidos naturales que han sido mutados a un residuo lisina. Específicamente, el Ejemplo 3 en las páginas 59-60 de la memoria descriptiva y las Figuras 7 y 8 describen la preparación de inmunoglobulinas conjugadas que comprenden residuos de aminoácidos naturales que han sido mutados a un residuo lisina, incluyendo, por ejemplo, T120K, T135K, S136K, G137K, T139K, S192K, L193K en la región CH1; D221K, T223K, H224K y T225K en la región de la bisagra superior; M252K en la región CH2, P445K en la región CH3, L201K, S202K y E213K en la región kappa; y Q187K y E213K en la región lambda. Las inmunoglobulinas conjugadas que comprenden residuos de aminoácidos naturales que se han mutado a un residuo lisina también se describen en el Ejemplo 7 en las páginas 64-66 de la memoria descriptiva, incluyendo, por ejemplo, las combinaciones de T135K en la cadena pesada y L201K en la cadena liviana; T135K en la cadena pesada y S202K en la cadena liviana; T135K y L448 en la cadena pesada; T135K y L448 en la cadena pesada y L201K en la cadena liviana; T135K y L448 en la cadena pesada y S202K en la cadena liviana; S136K en la cadena pesada y S202K en la cadena liviana; S136K y N297K en la cadena pesada y S202K en la cadena liviana; y S136K, N297K y P445K en la cadena pesada y S202K en la cadena liviana. Las inmunoglobulinas conjugadas que comprenden residuos de aminoácidos naturales que se han mutado a un residuo lisina también se describen en el Ejemplo 8 en las páginas 66-67 de la memoria descriptiva, incluyendo, por ejemplo, N297K, M252K y P445K o L445K. Asimismo, los Fab conjugados que comprenden residuos de aminoácidos naturales que se han mutado a un residuo lisina también se describen en el Ejemplo 9 en las páginas 67-69, incluyendo, por ejemplo,

D221K, T223K, H224K, T225K, C226K, P227K, P228K, C229K, P230K, A231K, P232K, E233K, L234K y L235K en la región de las bisagras.

La memoria descriptiva también revela y ejemplifica varios sustratos donantes de acilo, incluidos los sustratos donantes de acilo de acuerdo con las fórmulas (I), (II), (III) y (IV). Específicamente, los párrafos [0144] - [0167] en las páginas 43-44 de la memoria descriptiva describen más específicamente diferentes características estructurales de los sustratos donantes de acilo de las fórmulas (I), (II), (III) y (IV). Asimismo, el Ejemplo 3 en las páginas 59-60, el Ejemplo 4 en la página 61, el Ejemplo 7 en las páginas 64-66, el Ejemplo 8 en las páginas 66-67 y el Ejemplo 9 en las páginas 67-69 de la memoria ejemplifican inmunoglobulinas conjugadas con varios sustratos donantes de acilo tales como Z-Gln-Gly-CAD-biotina. El Ejemplo 6 en las páginas 65-67 y el Ejemplo 7 en las páginas 67-69 ejemplifican inmunoglobulinas conjugadas con sustratos donantes de acilo Z-Gln-Gly-N3 y Z-Gln-Gly-PEG2-BCN.

Por lo tanto, la solicitud describe y ejemplifica numerosas inmunoglobulinas conjugadas que comprenden los residuos lisina modificados específicos y los sustratos donantes de acilo requeridos por las reivindicaciones.

Se describen y ejemplifican asimismo numerosas secuencias de inmunoglobulinas. En este sentido, el solicitante rechaza la objeción del examinador de que "la solicitud no ha explorado cualquier secuencia de inmunoglobulina que comprenda residuos de lisina modificados". El solicitante sostiene que la memoria descriptiva proporciona no solo una plétora de ejemplos específicos de las secuencias de anticuerpos reivindicadas, sino también datos extensos que caracterizan funcionalmente las numerosas secuencias de diferentes inmunoglobulinas. En particular, no solo se describe una variedad y/o número suficiente de especies de una inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de ésta, sino que también ejemplifica inmunoglobulinas conjugadas de diferentes clases, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, así como fragmentos de anticuerpo Fab conjugados (ver el Ejemplo 3 en las páginas 59-60, el Ejemplo 4 en las páginas 60-61, el Ejemplo 8 en las páginas 66-67 y el Ejemplo 9 en las páginas 67-69 de la memoria). Las secuencias de las numerosas especies de anticuerpos ejemplificadas en los Ejemplos se exponen en la Tabla 9 en las páginas 73-115 y en el listado de secuencias. Ver, por ejemplo, al menos las SEQ ID NO: 28, 29, 60-63, 77, 100, 155, 187, 188, 194 y 240-242.

Más específicamente, el Ejemplo 3 proporciona niveles de conjugación para los mutantes T135K, S136K, L193K, D221K, T223K, H224K, T225K, M252K, P445K, L201K, S202K y E213K (ver también las Figuras 7 y 8 y las secuencias de anticuerpos asociadas en la Tabla 9). En particular, las Figuras 7 y 8 proporcionan datos que muestran los niveles de conjugación de estos anticuerpos seleccionados para transaminación. El ejemplo 8 proporciona datos que muestran que la Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 son idénticas en un 89,2% (ver también la Figura 10 que proporciona alineamientos de secuencia entre los isotipos), y que también se pueden realizar sustituciones de lisina en posiciones análogas a IgG1 en IgG2, IgG3 e IgG4 (ver, por ejemplo, la Tabla 7, que muestra la conjugación para posiciones equivalentes a N297K, M252K y P445K, y las secuencias de anticuerpos

asociadas en la Tabla 9 y el listado de secuencias). Asimismo, el Ejemplo 9 proporciona datos que demuestran los sitios de transamidación en la región Fab' para al menos D221K, T223K, H223K y T225K (ver, por ejemplo, la Tabla 8 y las secuencias asociadas en la Tabla 9 y el listado de secuencias).

Por lo tanto, la memoria descriptiva describe y ejemplifica muchas secuencias de inmunoglobulinas que comprenden un residuo lisina modificado y además proporciona una amplitud de datos que las caracterizan.

Teniendo en cuenta lo anterior, el solicitante afirma que las presentes reivindicaciones están descritas de manera suficiente y son reproducibles. Por ende, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

3. Determinación del estado de la técnica

El examinador argumenta que materia de invención recitada en la presente solicitud carece de nivel inventivo frente a las enseñanzas de los documentos “Transglutaminase-Based ChemoEnzymatic Conjugation Approach Yields Homogeneous Antibody–Drug Conjugates” (D1) y “Modification of Different IgG1 Antibodies via Glutamine and Lysine using Bacterial and Human Tissue Transglutaminase” (D2). A este respecto, mi representada desea poner de presente que no comparte la opinión del Señor Examinador y a continuación, se presentan argumentos detallados contra este rechazo.

3.1 Nivel inventivo

La materia de invención recitada en el nuevo pliego reivindicatorio se dirige en general a una inmunoglobulina conjugada que comprende una inmunoglobulina o una porción de unión al antígeno de esta y a un sustrato donante de acilo. La inmunoglobulina conjugada reivindicada comprende un residuo lisina modificado, que es un residuo de aminoácido natural que ha sido mutado a un residuo lisina seleccionado del grupo que consiste en T135K, S136K, L193K, D221K, T223K, H224K, T225K, M252K, N297K y P445K en una región constante de una cadena pesada de la inmunoglobulina, o parte de la misma que se une al antígeno; L201K y S202K en una región constante kappa de una cadena liviana de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta y E213K en una región constante lambda de una cadena liviana de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta; en donde los residuos de aminoácidos se numeran según el sistema de numeración de la UE. Las inmunoglobulinas reivindicadas también comprenden un sustrato donante de acilo según una de las fórmulas (I), (II), (III) o (IV). Las presentes reivindicaciones también se refieren a métodos para generar una inmunoglobulina conjugada y a una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina conjugada.

Como se indica en el párrafo [0012] de la presente solicitud:

aunque no se observó una modificación de las lisinas de inmunoglobulinas de tipo salvaje por una transglutaminasa microbiana, cuando se introdujo un

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

De hecho, como se describió en detalle anteriormente, el solicitante demostró mediante numerosos ejemplos que varios residuos de lisina modificados, incluidos los residuos de lisina modificados específicos que requieren las reivindicaciones, pueden funcionar como aceptores de acilo en una reacción de transglutaminación para producir una inmunoglobulina conjugada. En consecuencia, el efecto técnico asociado con la invención reivindicada es la provisión de nuevas inmunoglobulinas conjugadas en las que los agentes terapéuticos o de diagnóstico se conjugan con un residuo lisina presente en la inmunoglobulina de una manera predecible y específica del sitio.

Referencias citadas

Por el contrario, el D1 describe una reacción de transamidación entre una glutamina presente en una inmunoglobulina y un sustrato aceptor de acilo que comprende una amina primaria. El D1 no enseña o sugiere una reacción de transamidación entre un residuo lisina comprendido en una inmunoglobulina o una porción de unión al antígeno de esta y una glutamina comprendida en un sustrato donante de acilo, como lo requieren las reivindicaciones. Por lo tanto, la reacción de conjugación descrita en el D1 implica glutamina, y no lisina, mucho menos una lisina modificada, comprendida en una inmunoglobulina, y mucho menos los residuos lisina modificados específicos que requieren las reivindicaciones. Ver la Figura 1 del D1 que muestra que la glutamina que actúa como donante de acilo de acuerdo con las enseñanzas del D1 es parte de una inmunoglobulina.

El D1 no enseña o sugiere una inmunoglobulina o una porción de unión a antígeno de esta que comprenda un residuo lisina modificado, y mucho menos cualquiera de los residuos de lisina modificados específicos como lo requieren las reivindicaciones. De hecho, el D1 enseña específicamente que el método allí descrito es ventajoso porque no requiere ingeniería previa de la inmunoglobulina. Ver la página 570, columna izquierda, último párrafo de Dennler que indica que:

*reportamos un procedimiento para obtener ADC homogéneos **que no requiere ingeniería previa de la inmunoglobulina** a nivel de ADN (énfasis agregado).*

Por tanto, el D1 **se aleja** de la invención actualmente reivindicada que requiere una lisina modificada en una inmunoglobulina o en una porción de unión al antígeno de esta. Sobre la base del D1, un experto en la materia no tendría la razón ni la motivación necesaria para producir una inmunoglobulina o una porción de unión a antígeno de esta que comprenda un residuo lisina modificado, y además no tendría expectativa razonable de éxito de llegar a la invención reivindicada.

El D2 enseña una reacción de transamidación que implica residuos de lisina nativos, es decir, no modificados genéticamente. Específicamente, como se muestra en la Figura 1, en el D2 se usa una reacción de transamidación para conjugar inmunoglobulinas chCE7 y chCE7_{agl} con un sustrato marcado con fluorescencia (ver la página 273, columna izquierda, sección titulada “Marcado de anticuerpos enzimáticos”). El D2 no enseña o sugiere ningún residuo lisina modificado, y mucho menos los residuos lisina modificados como requieren las reivindicaciones, ni tampoco el uso de una inmunoglobulina o una porción de unión al antígeno de esta que comprende un residuo lisina modificado en una reacción de transamidación.

Contrariamente a las enseñanzas de D2, el solicitante demostró en el ejemplo 2 descrito en los párrafos [0209] - [0210] de la presente memoria descriptiva que las lisinas nativas presentes en una inmunoglobulina no se pueden modificar mediante transamidación. Específicamente, el solicitante hizo reaccionar varios anticuerpos IgG con un sustrato donante de acilo y transglutaminasa, y analizó los anticuerpos para detectar la presencia de conjugación. Como se describe en el párrafo [0210] en la página 58 de la presente solicitud y se demuestra en la Figura 10, el solicitante ha observado que

aunque existen 42-50 lisinas aceptoras de acilo potenciales en los diferentes anticuerpos, sorprendentemente ni la HC ni la LC fueron modificadas por el sustrato donante de acilo.

Asimismo, como se describe en el párrafo [0239] en la página 70 de la presente memoria descriptiva con referencia al D2,

Dado el número de lisinas nativas en los bucles y giros expuestos dentro de un anticuerpo, fue inesperado no encontrar ningún aceptor de acilo adecuado sobre ningún anticuerpo evaluado. Estos resultados contrastan claramente con el concepto previo en el campo, incluyendo aquellos informados por Mindt et al., 2008, quienes supuestamente demostraron la conjugación de un promedio de 0,3 moléculas de un colorante fluorescente con un residuo lisina natural sobre el anticuerpo chCE7. Presuntamente, Mindt también informó un nivel bajo (0,1 moléculas/anticuerpo) de transamidación de un sustrato aceptor de acilo para el mismo anticuerpo, chCE7. Sin embargo, numerosas publicaciones posteriores no pudieron

repetir los hallazgos de Mindt (véase Strop et al., 2013; Jeger et al., 2010; y Siegmund et al., 2015). Específicamente, Jeger indicó que “no se observó modificación de los chCE7 o RTX nativos con ninguno de los sustratos” (véase Jeger et al., 2010). Por ello, los hallazgos divulgados en Mindt probablemente se debían ya sea a la fluorescencia basal del ensayo o específico del aceptor o donante de acilo ubicados en las regiones variables de chCE7.

Por lo tanto, la presente solicitud enseña claramente que los hallazgos del D2 con respecto a la transamidación de lisinas nativas en chCE7 y chCE7_{agl} no pudieron ser replicados por otros, incluido el solicitante, como se demuestra en el Ejemplo 2. En vista de estos resultados, fue *sorprendente* que los residuos con lisina modificada de las inmunoglobulinas pudiesen transamidarse. Específicamente, como se explica en el párrafo [0013] en la página 6 de la presente:

La presente invención revela sorprendentemente que, aunque no se observó ninguna modificación de lisinas de inmunoglobulina de tipo salvaje por transglutaminasa microbiana, cuando se introdujo un residuo lisina modificado en la inmunoglobulina, o en una parte de unión a antígeno de esta, la transglutaminasa microbiana fue capaz de utilizar el residuo lisina modificado como aceptor de acilo. Sorprendentemente, la conjugación del residuo lisina modificado usando transglutaminasa microbiana conduce a la incorporación predecible y específica del sitio de agentes funcionales conjugados. Además, la manipulación de residuos de lisina en la región constante tiene una amplia aplicabilidad a cualquier inmunoglobulina, o porción de unión a antígeno de esta, independientemente de sus regiones variables y especificidad de unión.

Contrariamente a la afirmación del examinador, un experto en la técnica no tendría ninguna razón ni la motivación necesaria para combinar las enseñanzas del D1 y el D2. Esto se debe al menos a que el D1 ***se aleja*** de la invención reivindicada y también a que los hallazgos del D2 no podrían ser replicados por otros. Por lo tanto, un experto en la materia que desee generar inmunoglobulinas conjugadas no seleccionaría el D1 o el D2 como guía, y ciertamente no tendría ninguna motivación para combinar las enseñanzas de estos documentos.

Incluso en el improbable caso de que un experto en la técnica decidiera combinar las enseñanzas del D1 y el D2 (lo cual es absolutamente discutible para el solicitante), un experto en la técnica no podría tener una expectativa razonable de éxito en llegar a la invención reivindicada. Esto se debe al menos a que el D1 y el D2, solos o en combinación, no enseñan o sugieren un residuo lisina modificado en una inmunoglobulina, y mucho menos los residuos lisina modificados específicos como requieren las reivindicaciones. El D1 y el D2, solos o en combinación, tampoco enseñan

o sugieren la conjugación de residuos de lisina modificados con los sustratos donantes de acilo específicos, según lo requieren las reivindicaciones.

Así entonces, las reivindicaciones de la presente solicitud son inventivas frente a las enseñanzas de los documentos D1 y/o D2 por sí solos o combinados.

4. Conclusión

Teniendo en cuenta las modificaciones introducidas en esta oportunidad y los argumentos que se presentan, es posible establecer que las reivindicaciones cumplen con los requerimientos de la Decisión 486.

5. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 67 reivindicaciones.
- Comprobante de pago en línea de las tasas oficiales por concepto de solicitud de examen de patentabilidad.
- Comprobante de pago en línea de tasas oficiales por concepto de modificaciones voluntarias.

Señora Directora,



Margarita Castellanos Abondano

C.C. No. **39.779.654** de Bogotá

T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.

Calle 117 No. 5A-35 - Bogotá, D.C.

Teléfono: 7560770

Bogotá, D.C.

MCA/mg

P5037



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2018/0013314 Recibo: 20-84392 Fecha: 20/10/2020	MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO CC: 39.779.654 Pago PSE No: 456604 CUS: 679754-609718747
--	--

Patente PCT
INMUNGLOBULINAS CONJUGADAS CON LISINA

Detalle del pago

Id.	Rentistico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-01	Solicitud examen de patentabilidad Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 1,133,000	\$ 1,133,000
TOTAL					\$ 1,133,000



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2018/0013314 Recibo: 20-84383 Fecha: 20/10/2020	MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO CC: 39.779.654 Pago PSE No: 456598 CUS: 679655-609717615
--	--

Patente PCT
INMUNGLOBULINAS CONJUGADAS CON LISINA

Detalle del pago

Id.	Rentistico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 167.000	\$ 167.000
TOTAL					\$ 167.000

REIVINDICACIONES

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

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

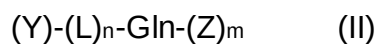
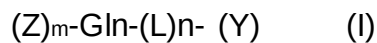
a) en donde la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, comprende un residuo lisina modificado, en donde el residuo lisina modificado es un residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, en donde el residuo de aminoácido natural que ha sido mutado a un residuo de lisina se selecciona del grupo que consiste en:

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

Leucina 201 (L201K) y Serina 202 (S202K) en una región constante kappa de una cadena liviana de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, y

Ácido glutámico 213 (E213K) en una región constante lambda de una cadena liviana de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, en donde los residuos de aminoácidos se numeran según el sistema de numeración de la UE;

b) en donde el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina, en donde el sustrato donante de acilo es de acuerdo con una de las fórmulas (I) o (II):



en donde

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

Gln es un residuo de aminoácido glutamina;

cada L es independientemente un conector lineal o ramificado de 1 a 20 átomos de carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono pueden estar opcional e independientemente reemplazados por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido; o cada L es opcional e independientemente un residuo de aminoácido;

m es un número entero de 0 a 5;

n es un número entero de 0 a 5; e

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

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

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

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

en donde el residuo de aminoácido natural que ha sido mutado a un residuo lisina se selecciona del grupo que consiste en:

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

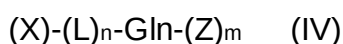
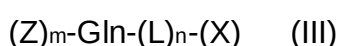
Leucina 201 (L201K) y Serina 202 (S202K) en una región constante kappa de una cadena liviana de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, y

Ácido glutámico 213 (E213K) en una región constante lambda de una cadena liviana de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta;

en donde los residuos de aminoácidos se numeran según el sistema de numeración de la UE; y

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

en donde el sustrato donante de acilo es de acuerdo con una de las fórmulas (III) o (IV):



en donde

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

Gln es un residuo de aminoácido glutamina;

cada L es independientemente un conector lineal o ramificado de 1 a 20 átomos de carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono pueden estar opcional e independientemente reemplazados por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido; o cada L es opcional e independientemente un residuo de aminoácido;

m es un número entero de 0 a 5;

n es un número entero de 0 a 5; y

X es un grupo reactivo,

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

ii) conjugar un agente terapéutico o de diagnóstico con el grupo reactivo del sustrato donante de acilo, para generar de esta manera la inmunoglobulina conjugada.

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

química click.

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

5. El método de la reivindicación 4, CARACTERIZADO PORQUE el Fab comprende toda la región bisagra o una región bisagra truncada.

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

en donde el residuo de aminoácido natural que ha sido mutado a residuo de lisina modificado es Serina 136 (S136K) en una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de esta y el segundo residuo de aminoácido natural que ha sido mutado al segundo el residuo de lisina modificado es Serina 202 (S202K) en una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de esta;

en donde el residuo de aminoácido natural que ha sido mutado al residuo de lisina modificado es Treonina 135 (T135K) en una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de esta, y el segundo residuo de aminoácido natural que ha sido mutado al segundo el residuo de lisina modificado es Leusina 201 (L201K) en una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de esta;

en donde el residuo de aminoácido natural que ha sido mutado al residuo de lisina modificado es Treonina 135 (T135K) en una cadena pesada de la inmunoglobulina, o

una porción de unión a antígeno de esta, y el segundo residuo de aminoácido natural que ha sido mutado al segundo el residuo de lisina modificado es Serina 202 (S202K) en una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de esta;

en donde la inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de esta, comprende además un tercer residuo de lisina modificado, donde el tercer residuo de lisina modificado es una inserción de un tercer residuo lisina o un tercer residuo de aminoácido natural que ha sido mutado a un tercer residuo lisina, y donde la transglutaminasa microbiana conjuga el tercer residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo, opcionalmente

en donde el residuo de aminoácido natural que ha sido mutado al residuo de lisina modificado es Serina 136 (S136K) en una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de esta, el segundo residuo de aminoácido natural que ha sido mutado al segundo residuo lisina modificado es Asparagina 297 (N297K) en una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de esta, y el tercer residuo de aminoácido natural que ha sido mutado al tercer residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) en una cadena kappa liviana de la inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de esta, o

en donde la inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de esta, comprende además un cuarto residuo lisina modificado, en donde el cuarto residuo lisina modificado es un cuarto residuo lisina insertado o un cuarto residuo de aminoácido natural que ha sido mutado a un residuo lisina, y en donde la transglutaminasa microbiana conjuga el cuarto residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo, opcionalmente en donde el residuo de aminoácido natural que ha sido mutado al residuo lisina modificado es Serina 136 (S136K) en una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de esta, el segundo residuo de aminoácido natural que ha sido mutado al segundo residuo lisina modificado es Asparagina 297 (N297K) en una cadena pesada de la inmunoglobulina, o porción de unión al antígeno de esta, el tercer residuo de aminoácido natural que ha sido mutado al

tercer residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) en una cadena kappa liviana de la inmunoglobulina, o una porción de unión a antígeno de esta, y el cuarto residuo de aminoácido natural que ha mutado al cuarto residuo lisina modificado es Prolina 445 (P445K) en una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta.

7 El método de la reivindicación uno o la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, comprende una cadena liviana que comprende una inserción de uno a cuatro aminoácidos adicionales después de la cisteína 214, en donde el residuo lisina insertado es un residuo lisina que se ha insertado después de uno a cuatro aminoácidos adicionales, y en donde se ha insertado un residuo leucina después del residuo lisina, opcionalmente en donde la inserción de uno a cuatro aminoácidos adicionales después de la cisteína 214, el residuo lisina que se ha insertado después de uno a cuatro aminoácidos adicionales y el residuo leucina que se ha insertado después del residuo lisina comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en GKL, GGKL, GSKL y GSGKL.

8. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde cada L es de manera independiente una unidad de polietilenglicol (PEG) ($-O((CH_2)_2)-$), etilamina ($-NH((CH_2)_2)-$) o propilamina ($-NH((CH_2)_3)-$); y en donde n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

9. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), en donde Z es un grupo CBZ y L es un aminoácido.

10. El método de la reivindicación 9, CARACTERIZADO PORQUE L es Gly; m es 1; y n es 0 o 1.

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

12. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE Y es auristatina F.

13. El método de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el sustrato

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

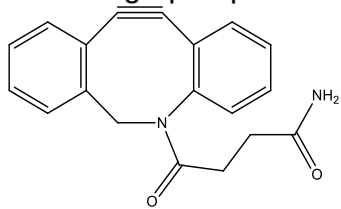
14. El método de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), en donde Z es un grupo CBZ y en donde uno o más L es un aminoácido.

15. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE L es Gly; m es 1; y n es 1.

16. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE m es 1; y n es 0.

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

18. El método de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE X es un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en (1R,8S,9s)-biciclo[6,1,0]non-4-



en-9-ilmetanol (BCN), (dibenzociclooctino; DBCO), trans-cicloocteno (TCO), azido (N₃), alquino, tetrazinmetilciclopropeno, norborneno, hidrazida/hidrazina y aldehído.

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

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

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

22. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoglobulina, o su porción de unión a antígeno, es una IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂, una inmunoglobulina IgM, IgD o IgE, o una porción de unión al antígeno de esta.

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

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

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

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

27. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADO PORQUE la relación entre el agente funcional y la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, es de entre 1:1 y 100:1 o entre 1:1 y 200:1.

28. Una inmunoglobulina conjugada, CARACTERIZADA PORQUE comprende una inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, y un sustrato donante de acilo, en donde

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

en donde el residuo de aminoácido natural que ha sido mutado a un residuo lisina se selecciona del grupo que consiste en:

Treonina 135 (T135K), Serina 136 (S136K), Leucina 193 (L193K), Ácido aspártico 221 (D221K), Treonina 223 (T223K), Histidina 224 (H224K),

Treonina 225 (T225K), Metionina 252 (M252K), Asparagina 297 (N297K) y Prolina 445 (P445K) en una región constante de una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta,

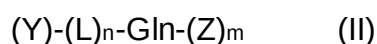
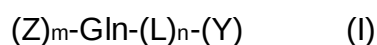
Leucina 201 (L201K) y Serina 202 (S202K) en una región constante kappa de una cadena liviana de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, y

Ácido glutámico 213 (E213K) en una región constante lambda de una cadena liviana de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta,

en donde los residuos de aminoácidos se numeran según el sistema de numeración de la UE;

b) el sustrato donante de acilo comprende un residuo glutamina,

en donde el sustrato donante de acilo es de acuerdo con una de las fórmulas (I) o (II):



en donde

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

Gln es un residuo de aminoácido glutamina;

cada L es independientemente un conector lineal o ramificado de 1 a 20 átomos de carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono pueden estar opcional e independientemente reemplazados por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido; o cada L es opcional e independientemente un residuo de aminoácido;

m es un número entero de 0 a 5;

n es un número entero de 0 a 5; e

Y es un agente terapéutico o un agente de diagnóstico,

en donde el residuo lisina modificado de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, está conjugado con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo del agente funcional.

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

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

donde el residuo de aminoácido natural que ha sido mutado a un residuo de lisina se selecciona del grupo que consiste en:

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

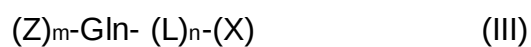
Leucina 201 (L201K) y Serina 202 (S202K) en una cadena kappa liviana de la inmunoglobulina, o porción de unión al antígeno de esta y

Ácido glutámico 213 (E213K) en una cadena lambda liviana de la inmunoglobulina, o porción de unión a antígeno de esta;

en donde los residuos de aminoácidos se numeran según el sistema de numeración de la UE;

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

en donde el sustrato donante de acilo es de acuerdo con una de las fórmulas (III) o (IV):



en donde

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

Gln es un residuo de aminoácido glutamina;

cada L es independientemente un conector lineal o ramificado de 1 a 20 átomos de carbono, en donde uno o más de los átomos de carbono pueden estar opcional e independientemente reemplazados por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y en donde cada átomo de carbono y nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido; o cada L es opcional e independientemente un residuo de aminoácido;

m es un número entero de 0 a 5;

n es un número entero de 0 a 5; y

X es un grupo reactivo,

c) el grupo reactivo se conjuga con un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.

30. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 59 o la reivindicación 60, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, es un fragmento de unión al antígeno (Fab), y en donde el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina se selecciona del grupo que consiste en: Ácido aspártico 221 (D221K), Treonina 223 (T223K), Histidina 224 (H224K) y Treonina 225 (T225K), sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta.

31. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 30, CARACTERIZADA PORQUE el Fab comprende toda la región bisagra.

32. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 30, CARACTERIZADA PORQUE el Fab comprende una región bisagra troncada.

33. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28 o la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, comprende además un segundo residuo lisina modificado, en donde el segundo residuo lisina modificado es un segundo residuo lisina insertado o un segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y en donde el segundo residuo lisina modificado está conjugado con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo.

34. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 33, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina

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

35. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 33, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Treonina 135 (T135K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Leucina 201 (L201K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta.

36. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 33, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Treonina 135 (T135K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, y el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta.

37. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 34, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, comprende además un tercer residuo lisina modificado, en donde el tercer residuo lisina modificado es un tercer residuo lisina insertado o un tercer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y en donde el tercer residuo lisina modificado está conjugado con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo.

38. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 37, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Asparagina 297 (N297K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta,

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

39. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 37, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, comprende además un cuarto residuo lisina modificado, en donde el cuarto residuo lisina modificado es un cuarto residuo lisina insertado o un cuarto residuo de aminoácido natural que se ha mutado en un residuo lisina, y en donde el cuarto residuo lisina modificado está conjugado con el residuo glutamina del sustrato donante de acilo.

40. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el residuo lisina modificado es Serina 136 (S136K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, el segundo residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el segundo residuo lisina modificado es Asparagina 297 (N297K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, el tercer residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el tercer residuo lisina modificado es Serina 202 (S202K) sobre una cadena liviana kappa de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, y el cuarto residuo de aminoácido natural que se ha mutado en el cuarto residuo lisina modificado es Prolina 445 (P445K) sobre una cadena pesada de la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta.

41. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28 o la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, comprende una cadena liviana que comprende una inserción de uno a cuatro aminoácidos adicionales después de la cisteína 214, en donde la inserción del residuo lisina es un residuo lisina que se ha insertado después de dichos uno a cuatro aminoácidos adicionales, y en donde se ha insertado un residuo leucina después del residuo lisina.

42. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 41, CARACTERIZADA PORQUE la inserción de uno a cuatro aminoácidos adicionales después de la cisteína 214, el residuo lisina que se ha insertado después de dichos uno a cuatro aminoácidos

adicionales y el residuo leucina que se ha insertado después del residuo lisina comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: GKL, GGKL, GGSKL y GGSGKL.

43. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28, CARACTERIZADA PORQUE el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde cada L es de manera independiente una unidad de polietilenglicol (PEG) ($-O((CH_2)_2)-$), etilamina ($-NH((CH_2)_2)-$) o propilamina ($-NH((CH_2)_3)-$); y en donde n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

44. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28, CARACTERIZADA PORQUE el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (I), en donde Z es un grupo CBZ y en donde L es un aminoácido.

45. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 44, CARACTERIZADA PORQUE L es Gly; m es 1; y n es 0.

46. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 44, CARACTERIZADA PORQUE L es Gly; m es 1; y n es 1.

47. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28, CARACTERIZADA PORQUE el agente funcional que comprende el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (II), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un L es Gly.

48. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28, CARACTERIZADA PORQUE el agente funcional Y es auristatina F.

49. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), y en donde Z es un grupo CBZ; en donde cada L es de manera independiente una unidad de polietilenglicol (PEG) ($-O((CH_2)_2)-$), etilamina ($-NH((CH_2)_2)-$) o propilamina ($-NH((CH_2)_3)-$); y en donde n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

50. El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (III), en donde Z es un grupo CBZ y en donde uno o más L es un aminoácido.

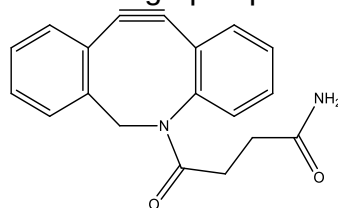
51. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 51, CARACTERIZADA PORQUE L es Gly; m es 1; y n es 1.

52. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 51, CARACTERIZADA

PORQUE m es 1; y n es 0.

53. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE el sustrato donante de acilo es acorde con la fórmula (IV), en donde Z es un grupo CBZ; m es 1; n es 1, 2 ó 3; y por lo menos un L es Gly.

54. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE X es un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en (1R,8S,9s)-



biciclo[6,1,0]non-4-en-9-ilmetanol (BCN), (dibenzociclooctino; DBCO), trans-cicloocteno (TCO), azido (N_3), alquino, tetrazinmetilciclopropeno, norborneno, hidrazida/hidrazina y aldehído.

55. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28 o la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE el agente terapéutico es un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de esta, un agente quimioterapéutico, un agente farmacéutico, un agente radioactivo, un agente citotóxico, un antibiótico, una molécula pequeña, ácido nucleico o un polipéptido.

56. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28 o la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE el agente de diagnóstico es un fluoróforo, un colorante fluorescente, un radionúclido o una enzima.

57. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28 o la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, es una inmunoglobulina IgG₁, o una porción de unión al antígeno de esta.

58. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28 o la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, es una inmunoglobulina IgG₂, IgG₃ o IgG₄, o una porción de unión al antígeno de esta.

59. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28 o la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, es una inmunoglobulina IgA₁, una inmunoglobulina IgA₂ o una inmunoglobulina IgM, o una porción de unión al antígeno de esta.

60. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28 o la reivindicación 29,

CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, es una inmunoglobulina IgD o IgE, o una porción de unión al antígeno de esta.

61. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28 o la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, es un fragmento de unión al antígeno (Fab).

62. La inmunoglobulina conjugada de cualquiera de las reivindicaciones 28-29, 30-36,37-40,41-42, 43-48 y 49-61, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, es una inmunoglobulina humana, o una porción de unión al antígeno de esta, o una inmunoglobulina humanizada, o una porción de unión al antígeno de esta.

63. La inmunoglobulina conjugada de cualquiera de las reivindicaciones 28-29, 30-36,37-40,41-42, 43-48 y 49-61, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, es una inmunoglobulina quimérica, o una porción de unión al antígeno de esta, o una inmunoglobulina no humana, o una porción de unión al antígeno de esta.

64. La inmunoglobulina conjugada de cualquiera de las reivindicaciones 28-29, 30-36,37-40,41-42, 43-48 y 49-61, CARACTERIZADA PORQUE la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas.

65. La inmunoglobulina conjugada de cualquiera de las reivindicaciones 28-29, 30-36,37-40,41-42, 43-48 y 49-61, CARACTERIZADA PORQUE la relación entre el agente funcional y la inmunoglobulina, o una porción de unión al antígeno de esta, es de entre 1:1 y 100:1 o entre 1:1 y 200:1.

66. La inmunoglobulina conjugada de la reivindicación 28 o la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE el agente funcional es un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de esta, y en donde la inmunoglobulina y el agente funcional se unen al mismo antígeno o se unen a antígenos diferentes.

67. Una composición farmacéutica, CARACTERIZADA PORQUE comprende la inmunoglobulina conjugada de cualquiera de las reivindicaciones 28-29, 30-36,37-40,41-42, 43-48 y 49-66 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.