



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 373**

51 Int. Cl.:

**C07C 249/08** (2006.01)

**C07C 249/14** (2006.01)

**C07C 251/54** (2006.01)

**C07K 1/107** (2006.01)

**C07K 14/61** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06837144 .2**

96 Fecha de presentación : **08.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1954710**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2008**

54

Título: **Aceleradores para la modificación de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales.**

30

Prioridad: **08.11.2005 US 734589 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.07.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.07.2011**

73

Titular/es: **AMBRX, Inc.**  
**10975 North Torrey Pines Road, Suite 100**  
**La Jolla, California 92037, US**

72

Inventor/es: **Tian, Feng y**  
**Miao, Zhenwei**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 362 373 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Aceleradores para la modificación de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales

**Campo de la invención**

5 Aceleradores para la modificación de moléculas que contienen un resto de carbonilo, incluidos aminoácidos no naturales y agentes que contienen un aminoácido no natural.

**Antecedentes de la invención**

10 La capacidad para incorporar aminoácidos no codificados genéricamente (es decir, "aminoácidos no naturales") en proteínas permite la introducción de grupos funcionales que podrían proporcionar valiosas alternativas a los grupos funcionales naturales, Tales como el epsilon-NH<sub>2</sub> de la lisina, el sulfhidrilo -SH de la cisteína, el grupo imino de la histidina etc. Se sabe que ciertos grupos químicos funcionales son inertes para los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente, pero reaccionan limpia y eficientemente para formar enlaces estables con grupos funcionales que se pueden incorporar en los aminoácidos no naturales.

15 En la actualidad se dispone de procedimientos para introducir de forma selectiva grupos químicos funcionales que no se encuentran en las proteínas, que son químicamente inertes para todos los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente y que pueden usarse para que reaccionen de forma eficiente y selectiva con reactivos que comprenden ciertos grupos funcionales para formar enlaces covalentes estables.

**Sumario de la invención**

20 En el presente documento se describen procedimientos, composiciones, técnicas y estrategias que comprenden aceleradores para la reacción de compuestos que contienen hidroxilamina con compuestos que contienen carbonilo. Los aceleradores son útiles en la síntesis de compuestos que contienen oxima. Los aceleradores, en algunas formas de realización, forman enlaces con los compuestos que contienen carbonilo y, como tales, estos nuevos compuestos son más reactivos con los compuestos que contienen hidroxilamina. En el presente documento se describen compuestos químicos que pueden modular la reacción de compuestos que contienen hidroxilamina con compuestos que contienen carbonilo. En el presente documento también se describen compuestos químicos que pueden disminuir la barrera de activación para la reacción de compuestos que contienen hidroxilamina con compuestos que contienen carbonilo. En el presente documento también se describen compuestos químicos que, cuando se incluyen en una reacción que comprende compuestos que contienen hidroxilamina y compuestos que contienen carbonilo, incrementan la velocidad a la que se forman compuestos que contienen oxima. Los compuestos que contienen hidroxilamina, carbonilo y oxima pueden incluir aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos modificados de aminoácidos no naturales. Los compuestos que contienen carbonilo incluyen compuestos que comprenden un resto de cetona aromática. Dichos compuestos que comprenden un resto de cetona aromática incluyen aminoácidos y polipéptidos. A modo de ejemplo, paraacetilfenilalanina o pAcF, es un aminoácido que comprende resto de cetona aromática.

30

35 En un aspecto están los compuestos que aceleran (en el presente documento denominados aceleradores) la velocidad de reacción entre los compuestos que contienen hidroxilamina y los compuestos que contienen carbonilo para formar compuestos que contienen oxima. En una forma de realización, el compuesto que contiene hidroxilamina es un aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido no natural o un polipéptido modificado de aminoácido no natural, y el compuesto que contiene carbonilo comprende una funcionalidad deseada. En otra realización, el compuesto que contiene oxima resultante comprende uno de los grupos deseados mencionados con anterioridad (es decir, una funcionalidad deseada). En un aspecto relacionado está el uso de dichos compuestos para acelerar la velocidad de reacción entre un resto que contiene hidroxilamina en un aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido no natural o polipéptido modificado de aminoácido no natural con un compuesto que contiene carbonilo que comprende un grupo deseado (Es decir, una funcionalidad deseada) para formar un aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido no natural o polipéptido modificado de aminoácido no natural que contiene oxima, que comprende un grupo deseado. En otro aspecto relacionado están las mezclas de reacción que contienen un acelerador, un aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido no natural o un polipéptido modificado de aminoácido no natural que contiene hidroxilamina y un compuesto que contiene carbonilo, que comprende un grupo deseado. En otro aspecto relacionado están los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales o polipéptidos modificados de aminoácidos no naturales que contienen oxima, que comprenden un grupo deseado, en el que dichos compuestos que contienen oxima se forman a partir de la reacción de un aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido no natural o polipéptido modificado de aminoácido no natural que contiene hidroxilamina con un compuesto que contiene carbonilo que comprende un grupo deseado en presencia de un acelerador. El grupo carbonilo no es un aldehído. En particular, el grupo carbonilo no es una cetona aromática.

45

50

55 En otra forma de realización, el compuesto que contiene carbonilo es un aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido no natural o un polipéptido modificado de aminoácido no natural, y el compuesto que contiene

hidroxilamina comprende una funcionalidad deseada. En otra realización, el compuesto que contiene oxima comprende uno de los grupos deseados mencionados con anterioridad. En un aspecto relacionado está el uso de dichos compuestos para acelerar la velocidad de reacción entre un resto que contiene carbonilo en un aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido no natural o polipéptido modificado de aminoácido no natural con un compuesto que contiene hidroxilamina que comprende un grupo deseado para formar un aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido no natural o polipéptido modificado de aminoácido no natural que contiene oxima que comprende un grupo deseado. En otro aspecto relacionado están las mezclas de reacción que contienen un acelerador, un aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido no natural o un polipéptido modificado de aminoácido no natural que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina que comprende un grupo deseado. En otro aspecto relacionado están los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales o polipéptidos modificados de aminoácidos no naturales que contienen oxima, que comprenden un grupo deseado, en el que dichos compuestos que contienen oxima se forman a partir de la reacción de un aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido no natural o polipéptido modificado de aminoácido no natural que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina que comprende un grupo deseado en presencia de un acelerador. El grupo carbonilo no es un aldehído. En particular, el grupo carbonilo no es una cetona aromática.

En un aspecto adicional están procedimientos para optimizar la reacción de un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima mediante selección de al menos un acelerador adecuado. En una forma de realización, dicha optimización comprende comparar el rendimiento del compuesto que contiene oxima en presencia de diferentes aceleradores, diferentes proporciones molares de aceleradores o una combinación de los anteriores. En otra realización, el rendimiento del compuesto que contiene oxima se monitoriza mediante cromatografía. En otra forma de realización, dicha optimización comprende comparar la cantidad de productos secundarios resultantes en presencia de diferentes aceleradores, diferentes proporciones molares de aceleradores o una combinación de los anteriores. En una forma de realización adicional, la cantidad de productos secundarios se monitoriza mediante cromatografía. En formas de realización adicionales, dicha optimización incluye cambiar las condiciones de reacción adicionales, incluidos, únicamente a modo de ejemplo, el pH y la temperatura. El grupo carbonilo no es un aldehído. En particular, el grupo carbonilo no es una cetona aromática.

En un aspecto están los aminoácidos no naturales basados en un enlace oxima, en el que el enlace oxima se formó en presencia de un acelerador descrito en el presente documento. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, el aminoácido no natural se incorpora en un polipéptido, es decir, dichas formas de realización son polipéptidos de aminoácidos no naturales. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, los aminoácidos no naturales están funcionalizados en sus cadenas laterales de modo que su reacción con una molécula de derivación genera un enlace oxima formado en presencia de un acelerador descrito en el presente documento. En otras formas de realización o formas de realización adicionales están los polipéptidos de aminoácidos no naturales que pueden reaccionar con una molécula de derivación formada en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento), para generar un polipéptido de aminoácido no natural que contiene una oxima. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, los aminoácidos no naturales se seleccionan de aminoácidos que tienen cadenas laterales de carbonilo, dicarbonilo o hidroxilamina. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, los aminoácidos no naturales comprenden cadenas laterales de carbonilo, o dicarbonilo en las que el carbonilo o dicarbonilo se selecciona a partir de una cetona o un aldehído. En otra forma de realización están los aminoácidos no naturales que contienen un grupo funcional que es capaz de formar una oxima tras tratamiento con un co-reactante adecuadamente funcionalizado en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En otra forma de realización o forma de realización adicional, los aminoácidos no naturales se asemejan a un aminoácido natural en su estructura, pero contienen uno de los grupos funcionales mencionados con anterioridad. En otra forma de realización o forma de realización adicional, los aminoácidos no naturales se asemejan a fenilalanina o tirosina (aminoácidos aromáticos); mientras que en una forma de realización distinta, los aminoácidos no naturales se asemejan a alanina y leucina (aminoácidos hidrófobos). En una forma de realización, los aminoácidos no naturales tienen propiedades que son distintas de las de los aminoácidos naturales. En una realización, dichas propiedades distintas son la reactividad química de la cadena lateral, en una forma de realización adicional, esta reactividad química distinta permite que la cadena lateral del aminoácido no natural sufre una reacción mientras es una unidad de un polipéptido mientras que las cadenas laterales de las unidades de aminoácidos naturales en el mismo polipéptido no sufren la reacción mencionada con anterioridad. En una forma de realización adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural tiene una química ortogonal con la de los aminoácidos naturales. En una forma de realización adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural comprende un resto que contiene electrófilos; en una forma de realización adicional, el resto que contiene electrófilos en la cadena lateral del aminoácido no natural puede sufrir un ataque nucleofílico para generar una proteína derivada de oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En cualquiera de las formas de realización mencionadas con anterioridad en este párrafo, el aminoácido no natural puede existir en forma de una molécula distinta o se puede incorporar en un polipéptido de cualquier longitud; en el último caso, el polipéptido puede incorporar además aminoácidos naturales o no naturales. En particular,

el grupo carbonilo es una cetona aromática.

En otro aspecto están las moléculas sustituidas con hidroxilamina para la producción de polipéptidos de aminoácido no natural derivados en base a un enlace oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En otra forma de realización están las moléculas sustituidas con hidroxilaminas usadas para derivar polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo o dicarbonilo mediante la formación de un enlace oxima entre la molécula de derivación y el polipéptido de aminoácido no natural que contiene carbonilo o dicarbonilo, en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En otras formas de realización, los polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo o dicarbonilo mencionados con anterioridad son polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen ceto. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, los aminoácidos no naturales que contienen carbonilo o dicarbonilo comprenden cadenas laterales seleccionadas de una cetona o un aldehído. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, las moléculas sustituidas con hidroxilamina comprenden una funcionalidad deseada. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, las moléculas sustituidas con hidroxilamina comprenden una funcionalidad deseada. En otra forma de realización, la cadena lateral del aminoácido no natural tiene una química ortogonal con respecto a la de los aminoácidos naturales, que permite que el aminoácido no natural reaccione de forma selectiva con las moléculas sustituidas con hidroxilamina en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En una forma de realización adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural comprende un resto que contiene electrófilos que reacciona de forma selectiva con la molécula que contiene hidroxilamina en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento); en una forma de realización adicional, el resto que contiene electrófilos de la cadena lateral del aminoácido no natural puede sufrir un ataque nucleofílico para generar una proteína derivada de oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En un aspecto adicional relacionado con las formas de realización descritas en este párrafo están los polipéptidos modificados de aminoácidos no naturales que son el resultado de la reacción de la molécula de derivación con los polipéptidos de aminoácidos no naturales en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). Otras formas de realización incluyen cualquier modificación posterior de los polipéptidos de aminoácidos naturales ya modificados. El grupo carbonilo no es un aldehído. En particular, el grupo carbonilo no es una cetona aromática.

En otro aspecto están las moléculas sustituidas con carbonilo o dicarbonilo para la producción de polipéptidos de aminoácido no natural derivados en base a un enlace oxima, en el que el enlace oxima se forma en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En una forma de realización adicional están las moléculas sustituidas con carbonilo o dicarbonilo usadas para obtener como derivados polipéptidos de aminoácido no natural que contienen hidroxilamina mediante la formación de un enlace oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En una forma de realización adicional, las moléculas sustituidas con carbonilo o dicarbonilo son moléculas sustituidas con aldehído o moléculas sustituidas con cetona. En otras formas de realización, las moléculas sustituidas con carbonilo o dicarbonilo comprenden una funcionalidad deseada. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, las moléculas sustituidas con aldehído son moléculas de polietilenglicol (PEG) sustituidas con aldehído. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, las moléculas sustituidas con cetona son moléculas de polietilenglicol (PEG) sustituidas con cetona. En una forma de realización adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural tiene una química ortogonal con respecto a la de los aminoácidos naturales, que permite que el aminoácido no natural reaccione de forma selectiva con las moléculas sustituidas con carbonilo o dicarbonilo en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En una forma de realización adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural comprende un resto (p. ej., un grupo hidroxilamina) que reacciona de forma selectiva con la molécula que contiene carbonilo o dicarbonilo en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento); en una forma de realización adicional, el resto nucleofílico de la cadena lateral del aminoácido no natural puede sufrir un ataque electrofílico para generar una proteína derivada de oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En un aspecto adicional relacionado con las formas de realización descritas en este párrafo están los polipéptidos modificados de aminoácidos no naturales que son el resultado de la reacción de la molécula de derivación con los polipéptidos de aminoácidos no naturales en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). Otras formas de realización incluyen cualquier modificación posterior de los polipéptidos de aminoácidos naturales ya modificados. El grupo carbonilo no es un aldehído. En particular, el grupo carbonilo no es una cetona

aromática.

En otro aspecto están los enlazadores mono, bi y multifuncionales para la generación de polipéptidos de aminoácido no natural derivados en base a un enlace oxima, en el que el enlace oxima se forma en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En una forma de realización están los enlazadores moleculares (bi y multifuncionales) que se pueden usar para conectar polipéptidos de aminoácido no natural que contienen carbonilo o dicarbonilo derivados a otras moléculas en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En otra forma de realización están los enlazadores moleculares (bi y multifuncionales) que se pueden usar para conectar polipéptidos de aminoácido no natural que contienen hidroxilamina a otras moléculas en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En otra forma de realización, los polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo o dicarbonilo comprenden una cadena lateral de cetona y/o aldehído. En una forma de realización que usa un polipéptido de aminoácidos no naturales que contienen hidroxilamina, el enlazador molecular contiene un grupo carbonilo o dicarbonilo en uno de sus extremos; en otras formas de realización, el grupo carbonilo o dicarbonilo se selecciona de un grupo aldehído o un grupo cetona. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, las moléculas enlazadoras sustituidas con hidroxilamina son moléculas enlazadoras de polietilenglicol (PEG) sustituidas con hidroxilamina. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, las moléculas enlazadoras sustituidas con carbonilo o dicarbonilo son moléculas enlazadoras de polietilenglicol (PEG) sustituidas con carbonilo o dicarbonilo. En todo el documento, la frase "otras moléculas" incluye, sólo a modo de ejemplo, proteínas, otros polímeros (ramificados y no ramificados), moléculas pequeñas y grupos también identificados como una "funcionalidad deseada". En otras formas de realización o formas de realización adicionales, los enlazadores moleculares que contienen hidroxilamina comprenden los mismos grupos o grupos equivalentes en todos los extremos, de modo que tras la reacción con un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene carbonilo o dicarbonilo en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento), el producto resultante es la homomultimerización del polipéptido de aminoácido no natural que contiene carbonilo o dicarbonilo. En formas de realización adicionales, la homo-multimerización es una homo-dimerización. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, los enlazadores moleculares que contienen carbonilo o dicarbonilo comprenden los mismos grupos o grupos equivalentes en todos los extremos, de modo que tras la reacción con un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene hidroxilamina en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento), el producto resultante es la homomultimerización del polipéptido de aminoácido no natural que contiene hidroxilamina. En formas de realización adicionales, la homo-multimerización es una homo-dimerización. En otra forma de realización, la cadena lateral del aminoácido no natural tiene una química ortogonal con respecto a la de los aminoácidos naturales, que permite que el aminoácido no natural reaccione de forma selectiva con las moléculas enlazadoras sustituidas con hidroxilamina en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En una forma de realización adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural tiene una química ortogonal con respecto a la de los aminoácidos naturales, que permite que el aminoácido no natural reaccione de forma selectiva con las moléculas enlazadoras sustituidas con carbonilo o dicarbonilo en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En una forma de realización adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural comprende un resto que contiene electrófilos que reacciona de forma selectiva con la molécula enlazadora que contiene hidroxilamina en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento); en una forma de realización adicional, el resto que contiene electrófilos de la cadena lateral del aminoácido no natural puede sufrir un ataque nucleofílico por la molécula enlazadora que contiene hidroxilamina para generar una proteína derivada de oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En un aspecto adicional relacionado con las formas de realización descritas en este párrafo están los polipéptidos ligados (modificados) de aminoácidos no naturales que son el resultado de la reacción de la molécula enlazadora con los polipéptidos de aminoácidos no naturales. Otras formas de realización incluyen cualquier modificación posterior de los polipéptidos de aminoácidos naturales ya ligados (modificados). El grupo carbonilo no es un aldehído. En particular, el grupo carbonilo es una cetona aromática.

En un aspecto están los procedimientos para obtener proteínas mediante la condensación de reactantes de carbonilo o dicarbonilo y de hidroxilamina en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento), para generar un producto basado en oxima. Incluidos en este aspecto están los procedimientos para obtener proteínas en base a la condensación de reactantes que contienen carbonilo o dicarbonilo e hidroxilamina, para generar un aducto de proteína derivada de oxima. En otras formas de realización o formas de realización adicionales están los procedimientos para obtener proteínas que contienen cetona con moléculas de de polietilenglicol (PEG) funcionalizadas con hidroxilamina. En

otros aspectos adicionales u otros aspectos más, la molécula sustituida con hidroxilamina puede incluir proteínas, otros polímeros (ramificados y no ramificados), moléculas pequeñas y grupos también identificados como una "funcionalidad deseada". El grupo carbonilo no es un aldehído. En particular, el grupo carbonilo es una cetona aromática.

5 También se divulgan procedimientos para la síntesis química de moléculas sustituidas con hidroxilamina para la obtención mediante derivación de proteínas sustituidas por ceto en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En un aspecto, la molécula sustituida con hidroxilamina puede comprender péptidos, otros polímeros (ramificados y no ramificados) y moléculas pequeñas. En un aspecto están los procedimientos para la preparación de moléculas sustituidas con hidroxilamina adecuadas para la obtención por derivación de polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo o dicarbonilo en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento), incluidos, sólo a modo de ejemplo, polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen ceto. En otro aspecto o un aspecto adicional, los aminoácidos no naturales se incorporan de forma específica de sitio durante la traducción *in vivo* de proteínas. En otra forma de realización o una forma de realización adicional, las moléculas sustituidas con hidroxilamina permiten la obtención mediante derivación específica de sitio de este aminoácido no natural que contiene carbonilo o dicarbonilo mediante ataque nucleofílico del grupo carbonilo o dicarbonilo para formar un polipéptido derivado de oxima de un modo específico de sitio, en el que el polipéptido derivado de oxima se forma en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En otro aspecto o un aspecto adicional, el procedimiento para la preparación de moléculas sustituidas con hidroxilamina proporciona acceso a una amplia variedad de polipéptidos obtenidos mediante derivación específica de sitio. En otro aspecto o un aspecto adicional están los procedimientos para sintetizar moléculas de polietilenglicol (PEG) funcionalizadas con hidroxilamina.

En otro aspecto están los procedimientos para la derivación química de polipéptidos de aminoácidos no naturales sustituidos con carbonilo o dicarbonilo, en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento), usando un enlazador bifuncional que contiene hidroxilamina. En una forma de realización están los procedimientos para unir un enlazador sustituido con hidroxilamina a una proteína sustituida con carbonilo o dicarbonilo mediante una reacción de condensación, para generar un enlace oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En otras formas de realización o formas de realización adicionales, el aminoácido no natural sustituido con carbonilo o dicarbonilo es un aminoácido no natural sustituido con ceto. En otras formas de realización o formas de realización adicionales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales se obtienen mediante derivación específica de sitio y/o con control preciso de la estructura tridimensional, usando un enlazador bifuncional que contiene hidroxilamina. En una forma de realización, dichos procedimientos se usan para unir enlazadores moleculares (mono, bi y multifuncionales) a polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo o dicarbonilo (incluidos, a modo de ejemplo, los que contienen ceto), en los que al menos uno de los extremos enlazadores contiene un grupo hidroxilamina que puede unir los polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo o dicarbonilo, mediante un enlace oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En otra forma de realización o una forma de realización adicional, estos enlazadores se usan para conectar los polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo o dicarbonilo a otras moléculas, incluidas, a modo de ejemplo, proteínas, otros polímeros (ramificados y no ramificados), moléculas pequeñas y grupos también identificados como una "funcionalidad deseada". El grupo carbonilo no es un aldehído. En particular, el grupo carbonilo es una cetona aromática.

45 En algunas formas de realización, el polipéptido de aminoácidos no naturales está unido a un polímero hidrosoluble. En algunas formas de realización, el polímero hidrosoluble comprende un resto de poli(etilenglicol). En algunas formas de realización, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero bifuncional. En algunas formas de realización, el polímero bifuncional está unido a un segundo polipéptido. En algunas formas de realización, el segundo polipéptido es idéntico al primer polipéptido, en otras formas de realización, el segundo polipéptido es un polipéptido diferente. En algunas formas de realización, el polipéptido de aminoácidos no naturales comprende al menos dos aminoácidos unidos a un polímero hidrosoluble que comprende un resto de poli(etilenglicol).

En algunas formas de realización, el polipéptido de aminoácidos no naturales comprende una sustitución, adición o delección que aumenta la afinidad del polipéptido de aminoácidos no naturales por un receptor. En algunas formas de realización, el polipéptido de aminoácidos no naturales comprende una sustitución, adición o delección que aumenta la estabilidad del polipéptido de aminoácidos no naturales. En algunas formas de realización, el polipéptido de aminoácidos no naturales comprende una sustitución, adición o delección que aumenta la solubilidad acuosa del polipéptido de aminoácidos no naturales. En algunas formas de realización, el polipéptido de aminoácidos no naturales comprende una sustitución, adición o delección que aumenta la solubilidad del polipéptido de aminoácidos no naturales producido en una célula huésped. En algunas formas de realización, el polipéptido de aminoácidos no naturales

comprende una sustitución, adición o delección que modula la resistencia a proteasa, la semivida en suero, la inmunogenicidad y/o la expresión relativa al polipéptido de aminoácidos sin la sustitución, adición o delección.

En algunas formas de realización, el polipéptido de aminoácidos no naturales es un agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso. En algunas formas de realización, el agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso comprende un aminoácido no natural que está unido a un polímero hidrosoluble. En algunas formas de realización, el polímero hidrosoluble comprende un resto de poli(etilenglicol). En algunas formas de realización, el polipéptido que comprende un aminoácido no natural unido a un polímero hidrosoluble previene la dimerización del correspondiente receptor. En algunas formas de realización, el polipéptido que comprende un aminoácido no natural unido a un polímero hidrosoluble previene la unión del polipéptido a una pareja de unión. En algunas formas de realización, el polipéptido que comprende un aminoácido no natural unido a un polímero hidrosoluble modula una o más propiedades o actividades del polipéptido.

En el presente documento también se describen procedimientos para producir un polipéptido de aminoácidos no naturales unido a un polímero hidrosoluble. En algunas formas de realización, el procedimiento comprende poner en contacto un polipéptido aislado que comprende un aminoácido no natural con un polímero hidrosoluble que comprende un resto que reacciona con el aminoácido no natural en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En algunas formas de realización, el aminoácido no natural incorporado es reactivo hacia un polímero hidrosoluble que es, por otro lado, no reactivo hacia cualquiera de los 20 aminoácidos comunes. En algunas formas de realización, el polímero hidrosoluble comprende un resto de poli(etilenglicol). El peso molecular del polímero puede ser de una amplia gama, incluidos entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede estar entre 100 Da y 100.000 Da, incluyendo 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, y 100 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero puede estar entre 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado. El peso molecular del PEG de cadena ramificada puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluidos, entre otros, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, y 1.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da.

En el presente documento también se describen composiciones que comprenden un polipéptido que comprende al menos uno de los aminoácidos no naturales descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el aminoácido no natural está unido a un polímero hidrosoluble. En el presente documento también se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido, en el que al menos un aminoácido está sustituido por un aminoácido no natural. En algunas formas de realización, el aminoácido no natural comprende un resto de sacárido. En algunas formas de realización, el polímero hidrosoluble está unido al polipéptido a través de un resto de sacárido. En el presente documento también se describen profármacos de los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos modificados de aminoácidos no naturales; en el presente documento además se describen composiciones que comprenden dichos profármacos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En el presente documento también se describen metabolitos de los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos modificados de aminoácidos no naturales; dichos metabolitos pueden tener una actividad deseada que complementa o sinergiza con la actividad de los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos modificados de aminoácidos no naturales. En el presente documento también se describe el uso de los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos modificados de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento para proporcionar un metabolito deseado a un organismo, incluido un paciente que necesite dicho metabolito.

En el presente documento también se describen bibliotecas de los aminoácidos no naturales descritos en el presente documento o bibliotecas de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento o

bibliotecas de los polipéptidos modificados de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento o una combinación de estas bibliotecas, en las que los miembros de la biblioteca comprenden un enlace oxima formado en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento).

5 En el presente documento también se describen procedimientos para detección selectiva en las bibliotecas descritas en el presente documento de una actividad deseada o para usar las matrices para la detección selectiva en las bibliotecas descritas en el presente documento o en otras bibliotecas de compuestos y/o polipéptidos y/o polinucleótidos una actividad deseada. En el presente documento también se describe el uso de datos de dicha actividad de la detección selectiva en la biblioteca para desarrollar y descubrir nuevos agentes terapéuticos, así como  
10 los propios agentes terapéuticos.

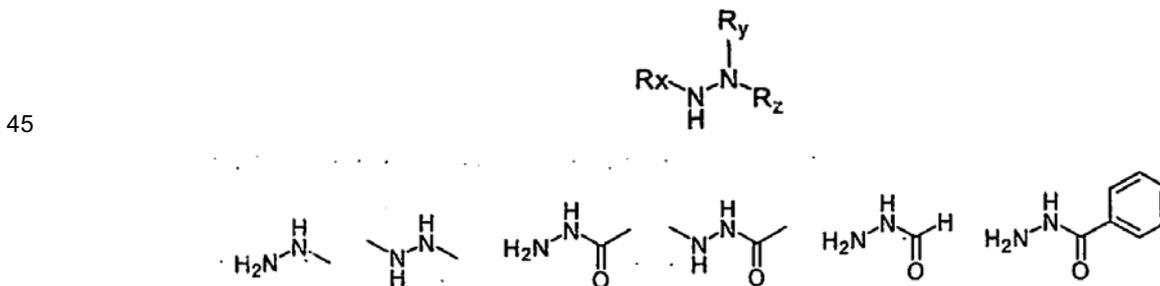
En el presente documento también se describen procedimientos para acelerar la conjugación de moléculas pequeñas, incluida, a modo de ejemplo, la conjugación de un grupo hidroxilamina en un reactivo con un grupo carbonilo en otro reactivo, en los que ningún reactivo es un aminoácido no natural. En otras palabras, el uso de aceleradores descritos en el presente documento no está limitado a la posterior funcionalización de aminoácidos no naturales y polipéptidos  
15 de aminoácidos no naturales, sino que también se puede usar para facilitar la formación de enlaces oxima entre dos reactivos cualquiera. A modo de ejemplo, esta forma de realización incluye el uso de aceleradores en la formación/construcción de bibliotecas dinámicas de reactivos que contienen hidroxilamina y reactivos que contienen carbonilo. Por supuesto, dichas bibliotecas dinámicas pueden incluir aminoácidos no naturales, pero dichas bibliotecas dinámicas no están limitadas a la inclusión de aminoácidos no naturales.

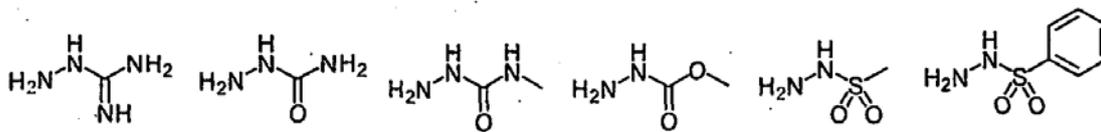
20 En el presente documento también se describen procedimientos de incrementar la semivida terapéutica, la semivida en suero o el tiempo de circulación de un polipéptido que comprende sustituir un aminoácido no natural por uno cualquiera o más aminoácidos en un polipéptido natural y/o añadir un aminoácido no natural en un polipéptido natural y/o unir el polipéptido a un polímero hidrosoluble a través de un enlace oxima formado en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el  
25 presente documento).

En el presente documento también se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido que comprenden un aminoácido no natural que comprende un enlace oxima formada en presencia un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento) y un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en procedimientos de tratar un paciente.  
30 En algunas formas de realización, el aminoácido no natural está unido a un polímero hidrosoluble.

En cualquiera de los aspectos o formas de realización mencionados con anterioridad, el uso de un acelerador incluye el uso de un único acelerador o múltiples aceleradores. Además, en cualquiera de los aspectos o formas de realización mencionados con anterioridad, la proporción molar entre el acelerador y el compuesto que contiene carbonilo incluye valores entre aproximadamente 0,5:1 a 5000:1, incluidos, a modo de ejemplo, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1,  
35 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, y 0,5:1. Además, en cualquiera de los aspectos o formas de realización mencionados con anterioridad, la proporción molar entre el acelerador y el compuesto que contiene hidroxilamina incluye valores entre aproximadamente 0,5:1 a 5000:1, incluidos, a modo de ejemplo, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, y 0,5:1. Además, en cualquiera de los aspectos o formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador incluye compuestos que contienen un resto de amina, un resto de semicarbazida, una hidrazina o un resto de hidrazida.  
40

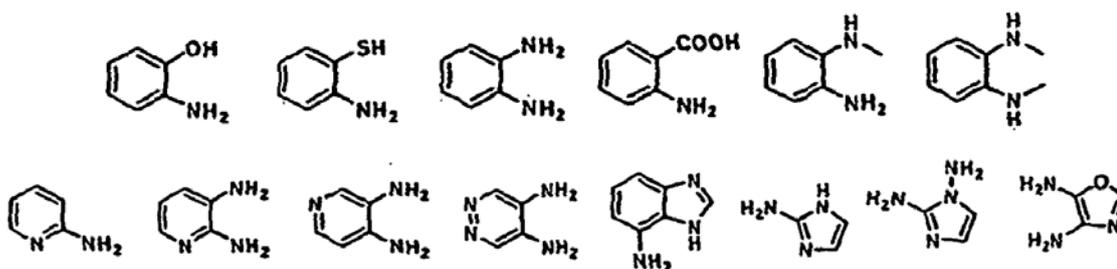
Además, en cualquiera de los aspectos o formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador se selecciona del grupo que consiste en aminas aromáticas bifuncionales, derivados de oxoamina y compuestos que tienen las estructuras siguientes:





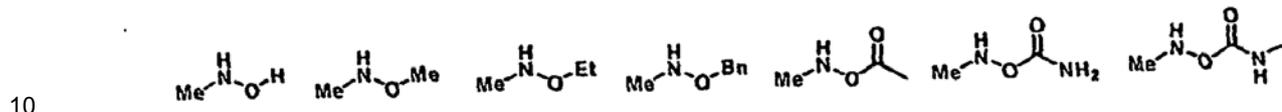
en las que  $R_x$ ,  $R_y$  y  $R_z$  se seleccionan del grupo que consiste en:  $L_x$ -H,  $L_x$ -alquilo,  $L_x$ -arilo,  $L_x$ -heteroarilo,  $L_x$ -alquenido,  $L_x$ -alquinilo,  $L_x$ -alcoxi y  $L_x$ -alquilamina, en los que  $L_x$  es un enlace, C(=O), C(=NH) y C(=NH)-NH y SO, SO<sub>2</sub>, en los que la amina aromática se selecciona del grupo:

5 aminas aromáticas bifuncionales:

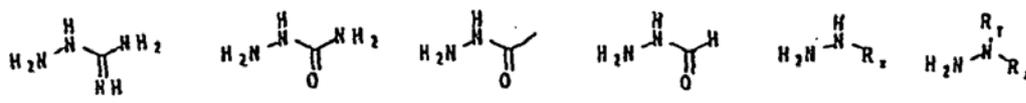


y en la que el derivado de oxoamina se selecciona del grupo:

Derivados de oxoamina:



En una forma de realización adicional, los compuestos aceleradores se seleccionan del grupo que consiste en:



15 en la que  $R_x$ ,  $R_y$  y  $R_z$  se seleccionan del grupo que consiste en:  $L_x$ -H,  $L_x$ -alquilo,  $L_x$ -arilo,  $L_x$ -heteroarilo,  $L_x$ -alquenido,  $L_x$ -alquinilo,  $L_x$ -alcoxi y  $L_x$ -alquilamina, en los que  $L_x$  es un enlace, C(=O), C(=NH) y C(=NH)-NH. Además, en cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador se selecciona de los compuestos presentados en las FIG. 5, FIG. 9 o FIG. 10, incluidos, a modo de ejemplo, cualquiera de los compuestos 6, 8, 10, 7 y 20 de la Figura 5. En cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador incluye un agente que puede formar una hidrazona tras la reacción con un grupo que contiene carbonilo. Además, en cualquiera de los aspectos mencionados con anterioridad, la actividad del acelerador depende de la velocidad de la reacción con el resto de cetona y la estabilidad del intermedio resultante. Además, en cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el pH de la mezcla de reacción que comprende el acelerador, el compuesto que contiene carbonilo y el compuesto que contiene hidroxilamina está entre aproximadamente 2,0 y 10;

20 entre aproximadamente 2,0 y 9,0; entre aproximadamente 2,0 y 8,0; entre aproximadamente 3,0 y 7,0; entre aproximadamente 4,0 y 6,0; entre 3,0 y 10,0; entre aproximadamente 4,0 y 10,0; entre aproximadamente 3,0 y 9,0; entre aproximadamente 3,0 y 8,0; entre aproximadamente 2,0 y 7,0; entre aproximadamente 3,0 y 6,0; entre aproximadamente 4,0 y 9,0; entre aproximadamente 4,0 y 8,0; entre aproximadamente 4,0 y 7,0; entre aproximadamente 4,0 y 6,5; entre aproximadamente 4,5 y 6,5; aproximadamente 4,0; aproximadamente 4,5; aproximadamente 5,0; aproximadamente 5,5; aproximadamente 6,0; aproximadamente 6,5; y aproximadamente 7,0. No obstante, obsérvese que para cualquier intervalo de pH descrito en el presente documento, la frase "entre aproximadamente" en referencia a un valor de pH bajo y alto significa que "aproximadamente" se aplica al valor de pH tanto bajo como alto; sólo a modo de ejemplo, "entre aproximadamente 3,0 y 10,0" es equivalente a "entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 10,0". Además, a menos que se indique lo contrario, para cualquier intervalo presentado en el presente documento, en el que "aproximadamente" se presenta antes de un límite inferior y no antes

35

de un límite superior (o en el caso en el que “aproximadamente” se coloca antes de un límite superior y no de un límite inferior), se entiende que quiere decir que la palabra “aproximadamente” aparece antes de ambos límites del intervalo. Además, en cualquiera de los aspectos o formas de realización mencionados con anterioridad, el término “acelerador” incluye un compuesto que tiene al menos una de las propiedades siguientes: (a) incrementa la velocidad de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que el incremento de la velocidad es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (b) disminuye la energía de activación de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la energía de activación es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (c) incrementa el rendimiento de un compuesto que contiene oxima de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina, en el que el incremento del rendimiento es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (d) disminuye la temperatura a la cual un compuesto que contiene carbonilo reacciona con compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la temperatura es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (e) disminuye el tiempo necesario para reaccionar un compuesto que contiene carbonilo reacciona con compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución del tiempo es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (f) disminuye la cantidad de reactivos necesaria para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la cantidad de reactivos es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (g) disminuye los productos secundarios resultantes de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de los productos secundarios es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (h) no destruye de forma irreversible la estructura terciaria de un polipéptido sometido a una reacción de formación de oxima en presencia de un acelerador (a excepción de, por supuesto, cuando el fin de la reacción es destruir dicha estructura terciaria); (i) se puede separar de un compuesto que contiene oxima al vacío; y (j) modula la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina. En otras formas de realización, el acelerador tiene al menos dos de las propiedades mencionadas con anterioridad, tres de las propiedades mencionadas con anterioridad, cuatro de las propiedades mencionadas con anterioridad, cinco de las propiedades mencionadas con anterioridad, seis de las propiedades mencionadas con anterioridad, siete de las propiedades mencionadas con anterioridad, ocho de las propiedades mencionadas con anterioridad, nueve de las propiedades mencionadas con anterioridad o todas las propiedades mencionadas con anterioridad. En una forma de realización adicional, el acelerador no tiene ninguna de las propiedades mencionadas con anterioridad.

Se entenderá que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir sólo formas de realización concretas. El ámbito de los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en el presente memoria documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “uno”, “una” y “el/la” incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que pertenecen las invenciones descritas en el presente documento entiende habitualmente. Aunque en la práctica o al probar las invenciones se puede usar cualquier procedimiento, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los procedimientos, dispositivos y materiales preferidos.

Los términos “alcoxi”, “alquilamino” y “alquiltio” (o tialcoxi) se usan en su sentido convencional y se refieren a los grupos alquilo unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

El término “alquilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada, o un radical de hidrocarburo cíclico, o combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, mono o poliinsaturado y puede incluir radicales di y multivalentes, que tiene el número de átomos de carbono designados (es decir, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> significa de uno a diez carbonos). Ejemplos de radicales hidrocarburo saturados incluye grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, entre otros, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y homólogos e isómeros superiores. Con el término “alquilo”, a menos que se indique lo contrario, también se pretende que incluya los derivados de alquilo definidos con más detalle más adelante, tales como “heteroalquilo”. Los grupos alquilo que están limitados a grupos hidrocarburo se denominan “homoalquilo”.

El término “alquileno” por sí mismo o como parte de otro sustituyente quiere decir un radical divalente derivado de un alcano, como son ejemplos, entre otros, las estructuras CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, y además incluye los grupos descritos más adelante como “heteroalquileno”. Normalmente, un grupo alquilo (o alquileno) tendrá de 1 a 24 átomos

de carbono siendo los grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono una forma de realización concreta de los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento. Un “alquilo inferior” o “alquileo inferior” es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, que, generalmente, tiene ocho o menos átomos de carbono.

5 El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de un modo similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos codificados naturales son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirrolisina y selenocisteína. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir un carbono  $\alpha$  que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, tal como homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metilmetionina sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (tales como, norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural.

15 En el presente documento se hace referencia a los aminoácidos bien por su símbolos de tres letras conocido o por el símbolo de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Asimismo, se puede hacer referencia a los nucleótidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

Un “grupo de modificación en el extremo amino” se refiere a cualquier molécula que se pueda unir al extremo amino de un polipéptido. De forma similar, un “grupo de modificación en el extremo carboxi” se refiere a cualquier molécula que se pueda unir al extremo carboxi de un polipéptido. Los grupos de modificación del extremo incluyen, entre otros, varios polímeros, péptidos o proteínas hidrosolubles, tales como seroalbúmina y otros restos que incrementan la semivida en suero de los péptidos.

Por “fragmento de anticuerpo” se quiere decir cualquier forma de un anticuerpo que no sea la forma de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpo en el presente documento incluyen anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de los anticuerpos de longitud completa y anticuerpos que se han sometido a ingeniería. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fc, Fab y (Fab')<sub>2</sub>, Fv monocatenario (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CRR, regiones variables, regiones estructurales, regiones constantes, cadenas pesadas, cadenas ligeras y regiones variables, y moléculas armazón alternativas que no son anticuerpos, anticuerpos biespecíficos y similares (Maynard & Georgiou, 2000, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2: 339-76; Hudson, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:395-402). Otra subestructura funcional es un Fv monocatenario (scFv), compuesto por las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de inmunoglobulina unidas de forma covalente por un enlazador peptídico (S-z Hu y col., 1996, Cancer Research, 56, 3055-3061). Estas pequeñas proteínas (Pm 25.000) normalmente conservan la especificidad y la afinidad por el antígeno en un único polipéptido y pueden proporcionar un bloque de construcción conveniente para moléculas más grandes específicas de antígeno. A menos que específicamente se indique otra cosa, las afirmaciones y reivindicaciones que usan el término “anticuerpo” o “anticuerpos” incluye específicamente “fragmento de anticuerpo” y “fragmentos de anticuerpo”.

El término “arilo” significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente de hidrocarburo aromático poliinsaturado que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (incluidos, entre otros, de 1 a 3 anillos), que se condensan juntos o se unen de forma covalente. El término “heteroarilo” se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O y S, en los que los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados y el(los) átomo(s) de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo se puede unir la resto de la molécula a través de un heteroátomo. Ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-benzimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo de arilo y heteroarilo citados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables que se describen a continuación.

Para resumir, el término “arilo”, cuando se usa en combinación con otros términos (incluidos, entre otros, ariloxi, ariltioxi, aralquilo) incluye anillos arilo y heteroarilo como se ha definido con anterioridad. Por tanto, el término “aralquilo” o “alcarilo” quiere decir que incluye los radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (incluidos, entre otros, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares), incluidos los grupos alquilo en los que un átomo de carbono (incluido, entre otros, un grupo metileno) se ha sustituido con, por ejemplo, un átomo de oxígeno (incluidos, entre otros, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo y similares).

Un “polímero bifuncional” se refiere a un polímero que comprende dos grupos funcionales pequeños que son capaces de reaccionar específicamente con otros restos (incluidos, entre otros, los grupos laterales de aminoácido) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un enlazador bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo en un componente biológicamente activo concreto y otro grupo reactivo con un grupo de un segundo componente biológico

se puede usar para formar un conjugado que incluye el primer componente biológicamente activo, el enlazador bifuncional y el segundo componente biológicamente activo. Se conocen muchos procedimientos y moléculas enlazadoras para la unión de varios compuestos a péptidos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea nº 188.256; las patentes de EE.UU. nº 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; y 4.569.789. Un “polímero multifuncional” se refiere a un polímero que comprende dos o más grupos funcionales pequeños que son capaces de reaccionar específicamente con otros restos (incluidos, entre otros, los grupos laterales de aminoácido) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un polímero bifuncional o multifuncional puede ser cualquier longitud o peso molecular deseado y puede seleccionarse para proporcionar un espacio o conformación concreta deseado entre una o más moléculas unidas a un compuesto y las moléculas a las que se une o el compuesto.

Las expresiones “molécula biológicamente activa”, “resto biológicamente activo” o “agente biológicamente activo”, cuando se usan en el presente documento, significan cualquier sustancia que pueda afectar a las propiedades físicas o bioquímicas de un sistema, vía, molécula o interacción biológicas relacionados con un organismo, incluidos virus, bacterias, bacteriófagos, transposones, priones, insectos, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, como se usa en el presente documento, moléculas biológicamente activas incluyen, entre otra, cualquier sustancia que tiene por objeto el diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos u otros animales, o, por otro lado, potencian el bienestar físico o mental de seres humanos o animales. Ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de molécula pequeña, fármacos duros, fármacos blandos, hidratos de carbono, átomos o moléculas inorgánicas, pigmentos, lípidos, nucleósidos, radionúclidos, oligonucleótidos, toxinas, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Clases de agentes biológicamente activos que son adecuados para usar con los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento incluyen fármacos, profármacos, radionúclidos, agentes de imagen, polímeros, antibióticos, fungicidas, agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes anti-tumorales, agentes cardiovasculares, agentes anti-ansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos y toxinas derivadas de microbios.

Co-plegamiento, como se usa en el presente documento, se refiere específicamente a procesos, reacciones o procedimientos de replegamiento que emplean al menos dos polipéptidos que interactúan entre sí y tienen como resultado la transformación de polipéptidos no plegados o plegados inadecuadamente en polipéptidos nativos plegados adecuadamente.

Una “ventana de comparación”, como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de una cualquiera de una serie de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de 20 a 600, normalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en las que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas una vez que las dos secuencias están óptimamente alineadas. En la técnica se conocen bien procedimientos de alineación de secuencias para comparación. Una alineación óptima de secuencias para comparación se puede efectuar mediante, incluidos, entre otros, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante el procedimiento de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, p. ej., Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento de 1995)).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 y Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible para el público a través del National Center for Biotechnology Information. Los parámetros del algoritmo BLAST  $W$ ,  $T$  y  $X$  determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) usa como defecto una longitud de texto ( $W$ ) de 11, una expectativa ( $E$ ) de 10,  $M=5$ ,  $N=4$  y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como parámetros por defecto una longitud de texto de 3, y una expectativa ( $E$ ) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alineaciones ( $B$ ) de 50, expectativa ( $E$ ) de 10,  $M=5$ ,  $N=4$  y una comparación de ambas hebras. Normalmente, el algoritmo BLAST se realiza con el filtro de “complejidad baja” apagado.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de la suma ( $(P(N))$ ), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca al azar una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la menor probabilidad de la suma en una comparación del ácido nucleico problema con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,2, inferior a aproximadamente 0,01 y, en otra forma de realización, inferior a aproximadamente 0,001.

La expresión “variantes modificadas de forma conservadora” se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos concretas, “variantes modificadas de forma conservadora” se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos o secuencias esencialmente idénticas. Dada la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican, todos ellos, el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, se puede alterar el codón y convertir en cualquiera de los correspondientes codones descritos sin que se altere el polipéptido codificado. Dichas variaciones en el ácido nucleico son “variaciones silentes”, que son una especie de variaciones modificadas de forma conservadora. En el presente documento, toda secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido también describe toda posible variación silente del ácido nucleico. Un experto en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (a excepción de AUG, que normalmente es el único codón para metionina, y TGG, que habitualmente es el único codón para triptófano) se puede modificar para dar una molécula funcionalmente idéntica. De acuerdo con esto, cada variación silente de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto en la técnica reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones en una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteren, añadan o delecten un solo aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante modificada de forma conservadora” en la que la alteración tuene como resultado la deleción de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. En la técnica son bien conocidas las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas de forma conservadora son, además de y no excluyen, variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de los procedimientos y las composiciones descritos en el presente documento.

Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras uno de otro:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M)

(véase, p. ej., Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2ª edición (Diciembre de 1993))

Los términos “cicloalquilo” y “heterocicloalquilo”, por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de “alquilo” y “heteroalquilo”, respectivamente. Por tanto, un cicloalquilo o heterocicloalquilo incluye enlaces de anillos saturados, parcialmente insaturados y completamente insaturados. Adicionalmente, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo y cicloheptilo. Ejemplos de heterocicloalquilo incluyen 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo y 2-piperazinilo. Adicionalmente, el término abarca estructuras de anillo bicíclico y tricíclico. De forma similar, el término “heterocicloalquileno” por sí mismo o como parte de otro sustituyente quiere decir un radical divalente derivado de heterocicloalquilo y el término “cicloalquileno” por sí mismo o como parte de otro sustituyente quiere decir un radical divalente derivado de cicloalquilo.

“Agente desnaturalizante” o “desnaturalizante”, como se usa en el presente documento, se define como cualquier compuesto o material que producirá un desplegamiento reversible de una proteína. La fuerza de un agente desnaturalizante o desnaturalizante se determinará mediante las propiedades y la concentración del agente desnaturalizante o desnaturalizante concreto. Agentes desnaturalizantes o desnaturalizantes adecuados pueden ser caotropos, detergentes, sustancias orgánicas, disolventes miscibles en agua, fosfolípidos o una combinación de dos o más de estos agentes. Caotropos adecuadas incluyen urea, guanidina y tiocianato sódico. Detergentes útiles pueden incluir, entre otros, detergentes fuertes tales como dodecilsulfato sódico, o éteres de polioxietileno (p. ej., detergentes Tween o Triton), SARKOSYL, detergentes no iónicos suaves (p. ej., digitonina), detergentes catiónicos suaves tales como N→2,3-(dioleoxi)-propil-N,N,N-trimetilamonio, detergentes iónicos leves (p. ej., colato sódico o desoxicolato

sódico) o detergentes zwitterónicas incluidas sulfobetaínas (Zwittergent), sulfato de 3-(3-cloramidopropil)dimetilamonio-1-propano (CHAPS) y sulfonato de 3-(3-cloramidopropil)dimetilamonio-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO). Se pueden usar como desnaturalizantes sustancias orgánicas, disolventes miscibles en agua, tales como acetonitrilo, alcoholes inferiores (especialmente alcoholes de C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> tal como etanol o isopropanol) o alcanodiolos inferiores (Especialmente alcanodiolos de C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> tales como etilenglicol). Fosfolípidos útiles en los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento pueden ser fosfolípidos naturales, tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, o derivados o variantes sintéticos de fosfolípidos tales como dihexanoilfosfatidilcolina o diheptanoilfosfatidilcolina.

La expresión "funcionalidad deseada", tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno cualquiera o tofos los grupos siguientes: un marcador; un pigmento; un polímero; un polímero hidrosoluble; un derivado de polietilenglicol; un fotoreticulador; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un radionúclido; un derivado de biotina; un punto cuántico; un nanotransmisor; un radiotransmisor; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo polipeptídico; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante metálico; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero hidrosoluble; una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, un resto que contiene metal; un resto radioactivo; un grupo funcional nuevo; un grupo que interacciona covalente o no covalentemente con otras moléculas; un resto fotoenrejado; un resto excitable por radiación actínica; un ligando; un resto fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; un resto que incorpora un átomo pesado; un grupo escindible químicamente; un grupo fotoescindible; una cadena lateral elongada; un azúcar unido a carbono; un agente redox activo; un aminotioácido; un resto tóxico; un resto marcado isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso a los electrones; un grupo magnético; un grupo de intercalación; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; una molécula pequeña; un ácido ribonucleico inhibidor, y cualquier combinación de los anteriores.

El término "dicarbonilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que contiene al menos dos restos seleccionados del grupo que consiste en -C(O)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>- y -C(S)-, incluidos grupos 1,2-dicarbonilo, grupos 1,3-dicarbonilo y grupos 1,4- dicarbonilo, y grupos que contienen al menos un grupo cetona y/o al menos un grupo aldehído y/o al menos un grupo éster y/o al menos un grupo de ácido carboxílico y/o al menos un grupo tioéster. Dichos grupos dicarbonilo incluyen dicetonas, cetoaldehídos, cetoácidos, cetoésteres y cetotioésteres. Además, dichos grupos pueden ser parte de moléculas lineales, ramificadas o cíclicas. Los dos restos en el grupo dicarbonilo pueden ser iguales o diferentes y pueden incluir sustituyentes que producirían, a modo de ejemplo, un éster, una cetona, un aldehído, un tioéster o una amida en cualquiera de los dos restos.

El término "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad del polipéptido de aminoácido no natural (modificado) que se está administrando, que aliviará en alguna medida uno o más de los síntomas de la enfermedad, afección o trastorno que se esté tratando. Las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácido no natural (modificado) descrito en el presente documento se pueden administrar para tratamientos profilácticos, potenciadores y/o terapéuticos.

Los términos "potencian" o "que potencian" significa incrementar o prolongar en grado, cantidad, potencia o duración un efecto deseado. Por tanto, respecto a potenciar el efecto de los agentes terapéuticos, el término "que potencia" se refiere a la capacidad de incrementar o prolongar, en potencia o duración, el efecto de otros agentes terapéuticos sobre un sistema. Una "cantidad potenciadora eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad adecuada para potenciar el efecto de otro agente terapéutico en un sistema deseado. Cuando se usa en un paciente, las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad y evolución de la enfermedad, trastorno o afección, la terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos y el criterio del médico encargado del tratamiento.

Como se usa en el presente documento, el término "eucariota" se refiere a organismos pertenecientes al dominio filogenético Eucarya, tal como animales (incluidos, entre otros, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluidas, entre otras, monocotiledóneas, dicotiledóneas, algas etc.), hongos, levaduras, flagelados, microsporita, protistas etc.

Las expresiones "grupo funcional", "resto activo", "grupo de activación", "grupo saliente", "sitio reactivo", "grupo químicamente reactivo" y "resto químicamente reactivo" se usan en la técnica y en el presente documento para hacer referencia a distintas porciones o unidades definibles de una molécula. Los términos son de algún modo sinónimos en las técnicas químicas y en el presente documento se usan para indicar las porciones de las moléculas que realizan alguna función o actividad y que son reactivas con otras moléculas.

El término "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada estable o un radical de hidrocarburo cíclico o combinaciones de los mismos,

que consiste en el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno y de azufre pueden, opcionalmente, estar oxidado y el heteroátomo de nitrógeno puede, opcionalmente, estar cuaternizado. El(los) heteroátomo(s) O, N y S y Si pueden introducirse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición por la cual el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Ejemplos incluyen  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{NOCH}_3$  y  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ . Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo,  $\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$  y  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . De forma similar, el término "heteroalquileno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como son ejemplos, entre otros,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  y  $-\text{CH}_2\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NHCH}_2-$ . Para los grupos de heteroalquileno, los mismos o diferentes heteroátomos también pueden ocupar uno o los dos extremos de la cadena (incluidos, entre otros, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino, aminoalquilenoxi y similares). Todavía más, para los grupos de enlace alquileno y heteroalquileno, la dirección en la que la fórmula del grupo de enlace está escrita no implica orientación del grupo de enlace. Por ejemplo, la fórmula  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  representa tanto  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  como  $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$ .

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" si tienen un porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, una identidad de aproximadamente un 60%, aproximadamente un 65%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 75%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 90% o aproximadamente un 95% sobre una región especificada) cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias (u otros algoritmos disponibles para las personas expertas en la técnica) o mediante alineación manual e inspección visual. Esta definición también se refiere a la complementaria de una secuencia problema. La identidad puede existir sobre una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 50 aminoácidos o nucleótidos, o sobre una región que tiene una longitud de 75-100 aminoácidos o nucleótidos, o, cuando no se especifique, sobre una secuencia completa de un polinucleótido o polipéptido.

Para comparar secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias problema. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias problema y de referencia se introducen en un ordenado, se designan las coordenadas de la subsecuencia, en caso necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se pueden usar los parámetros por defecto del programa o parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias problema con respecto a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa.

El término "aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, indica que el ácido nucleico o la proteína está libre de al menos algunos de los componentes celulares con los que está asociado en el estado natural, o que el ácido nucleico o la proteína se ha concentrado hasta un nivel mayor que la concentración de su producción *in vivo* o *in vitro*. Puede estar en un estado homogéneo. Las sustancias aisladas pueden estar en estado seco o semiseco, o en solución, incluida, entre otras, una solución acuosa. Puede ser un componente de una composición farmacéutica que comprende vehículos y/o excipientes adicionales farmacéuticamente aceptables. La pureza y homogeneidad normalmente se determinan usando técnicas de química analítica, tal como electroforesis en gel de poli(acrilamida) o cromatografía líquida de alto rendimiento. Se purifica sustancialmente una proteína que es la especie predominante presente en una preparación. En particular, un gen aislado se separa de los marcos de lectura abiertos que flanquean al gen y codifican una proteína distinta a la del gen de interés. El término "purificado" indica que un ácido nucleico o proteína da lugar a sustancialmente una banda en un gel de electroforesis. Particularmente, puede significar que el ácido nucleico o proteína tiene una pureza del al menos 85%, una pureza del al menos 90%, pureza del al menos 95%, pureza del al menos 99% o una pureza mayor.

El término "enlace" o "enlazador" se usa, en el presente documento, para hacer referencia a grupos o enlaces que normalmente se forman como resultado de una reacción química y habitualmente son enlaces o uniones covalentes (en el presente documento, el procedimiento de crear tal enlace o enlazador se denomina de enlace/enlazado o acoplamiento/acoplado, así como otros sinónimos reconocidos por los expertos en la técnica). Enlaces hidrolíticamente estables quiere decir que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con agua a valores útiles de pH, incluidos, entre otros, condiciones fisiológicas durante un periodo extendido de tiempo, quizá incluso indefinidamente. Enlaces hidrolíticamente inestables o degradables quiere decir que los enlaces se pueden degradar en agua o en soluciones acuosas, incluidas, por ejemplo, sangre. Enlaces enzimáticamente inestables o degradables quiere decir que el enlace puede degradarse mediante una o más enzimas. Como se entiende en la técnica, PEG y polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en la estructura del polímero o en el grupo enlazador entre la estructura del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula polimérica. Por ejemplo, los enlaces éster formados mediante la reacción de ácidos carboxílicos PEG o ácidos carboxílicos PEG activados con grupos alcoholes en un agente biológicamente activo normalmente se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar

el agente. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, entre otros, enlaces de carbonato; los enlaces imina fueron el resultado de la reacción de una amina y un aldehído; los enlaces éster fosfato se formaron mediante la reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que son el producto de la reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que son el producto de la reacción de un aldehído u un alcohol; enlaces ortoéster que son el producto de la reacción de un formiato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, incluidos, entre otros, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosfoamidita, incluidos, entre otros, en el extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo en 5' de un oligonucleótido.

Como se usa en el presente documento, el término “medio” o “medios” incluye cualquier medio de cultivo, solución, soporte sólido, semisólido o rígido que puede soportar o contener cualquier célula huésped, incluidas células huésped bacterianas, células huésped de levaduras, células huésped de insectos, células huésped vegetales, células huésped eucarióticas, células huésped de mamífero, células CHO, células huésped procariotas, células huésped *E.coli* o *Pseudomonas*, y contenidos celulares. Por tanto, el término puede abarcar el medio en el que la célula huésped ha crecido, por ejemplo el medio en el que se ha secretado el polipéptido, incluido el medio antes o después de una etapa de proliferación. El término también puede abarcar tampones o reactivos que contienen lisados de células huésped, tal como en el caso en el que el polipéptido se produce intracelularmente y las células huésped se lisan o rompen para liberar el polipéptido.

Un “metabolito” de un polipéptido de aminoácido no natural (modificado) divulgado en el presente documento es un derivado de dicho polipéptido de aminoácido no natural (modificado) que se forma cuando el polipéptido de aminoácido no natural (modificado) se metaboliza. El término “metabolito activo” se refiere a un derivado biológicamente activo de un polipéptido de aminoácido no natural (modificado) que se forma cuando el polipéptido de aminoácido no natural (modificado) se metaboliza. El término “metabolizado” se refiere a la suma de los procedimientos (incluidas, entre otras, reacciones de hidrólisis y reacciones catalizadas por enzimas) mediante los cuales una sustancia concreta es modificada por un organismo. Se puede obtener información adicional sobre el metabolismo en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª Edición, McGraw-Hill (1996). Metabolitos del polipéptido de aminoácidos no naturales (modificado) divulgados en el presente documento se pueden identificar mediante la administración del polipéptido de aminoácidos no naturales (modificado) a un huésped y análisis de muestras de tejido del huésped o mediante incubación del polipéptido de aminoácidos no naturales (modificado) con células hepáticas *in vitro* y análisis de los compuestos resultantes.

El término “modificado”, como se usa en el presente documento, se refiere a la presencia de una modificación postraducciona en un polipéptido. El término de forma “(modificado)” quiere decir que los polipéptidos que se están tratando están opcionalmente modificados, es decir, los polipéptidos que se están tratando pueden estar modificados o no modificados.

Como se usa en el presente documento, la expresión “semivida sérica modulada” quiere decir el cambio positivo o negativo en la semivida en circulación de un polipéptido modificado con respecto a su forma no modificada. La semivida en suero se mide tomando muestras de sangre en varios puntos de tiempo tras la administración del polipéptido y determinando la concentración de dicha molécula en cada muestra. La correlación de la concentración en suero con el tiempo permite el cálculo de la semivida en suero. Deseablemente, la mayor semivida en suero tiene un incremento de al menos aproximadamente dos veces, pero puede ser útil un incremento menor, por ejemplo, que permita un régimen de dosificación satisfactorio o que evite un efecto tóxico. En algunas formas de realización, el incremento es de al menos aproximadamente tres veces, al menos aproximadamente cuatro veces o de al menos aproximadamente diez veces.

La expresión “semivida terapéutica modulada”, como se usa en el presente documento, quiere decir el cambio positivo o negativo en la semivida de la cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido modificado con respecto a su forma no modificada. La semivida terapéutica se mide midiendo las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas del polipéptido en varios puntos de tiempo tras la administración. Deseablemente, el incremento de la semivida terapéutica permite un régimen de dosificación concreto beneficioso, una dosis total beneficiosa concreta, o evita un efecto indeseado. En algunas formas de realización, el incremento de la semivida terapéutica es el resultado del incremento de la potencia, el incremento o disminución de la unión de la molécula modificada a su diana, el incremento o disminución de la degradación de la molécula mediante enzimas, tales como proteasas, o un incremento o disminución de otro parámetro o mecanismo de acción de la molécula no modificada.

Como se usa en el presente documento, el término “no eucariota” se refiere a organismos no eucarióticos. Por ejemplo, un organismo no eucariótico puede pertenecer al dominio filogenético de Eubacterias (incluidas *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* etc.) o el dominio filogenético de Archaea (incluidos *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium* tales como *Haloferax volcanii* y *Halobacterium species NRC-1*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuropyrum pernix*, etc.).

Un "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína; otras expresiones que se pueden usar de forma sinónima con el término "aminoácido no natural" son "aminoácido codificado de forma no natural", "aminoácido que no se produce de forma natural" y varias versiones con guión y sin guión de las mismas. La expresión "aminoácido no natural" incluye, entre otros, aminoácidos que se producen de forma natural mediante modificación de un aminoácido codificado de forma natural (incluidos, entre otros, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína) pero que no se incorporan en una cadena polipeptídica en crecimiento mediante el complejo de traducción. Ejemplos de aminoácidos naturales que no están codificados de forma natural incluyen N-acetilglucosaminil-L-serina, N-acetilglucosaminil-L-treonina y O-fosfotirosina.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleótidos o ribonucleósidos y polímeros de los mismos en forma mono o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares como ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de un modo similar a los nucleótidos naturales. A menos que, de otro modo, se limite específicamente, el término también se refiere a análogos oligonucleotídicos que incluyen PNA (ácido peptidonucleico) del ADN usado en la tecnología antisentido, tal como fosforotioatos, fosforoamidatos. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico concreta también abarca implícitamente variantes de la misma modificadas de forma conservadora (incluidas sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados se sustituye con una base mixta y/o residuos de desoxinosina (Batzer y col., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka y col., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); y Rossolini y col., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

"Agente oxidante" como se usa en el presente documento respecto al replegamiento de proteínas se define como cualquier compuesto o material que puede extraer un electrón de un compuesto que se está oxidando. Agentes oxidantes adecuados incluyen glutatión oxidado, cistina, cistamina, ditiotreitól oxidado, eritreitol oxidado y oxígeno. Una amplia variedad de agentes oxidantes son adecuados para usar en los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "polialquilenglicol" se refiere a polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol y derivados de los mismos. El término "polialquilenglicol" abarca polímeros lineales y ramificados y pesos moleculares medios de entre 0,1 kDa y 100 kDa. Otras formas de realización de ejemplo se enumeran en, por ejemplo, catálogos de suministradores, tales como el catálogo de Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001).

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido se aplica igualmente a una descripción de un péptido y a una descripción de una proteína, y viceversa. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos naturales, así como a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un aminoácido no natural. Como se usa en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluidas proteínas de longitud completa, en las que los residuos de aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos covalentes.

La expresión "modificado postraduccionalmente" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que se produce en tal aminoácido después de que se ha incorporado en una cadena polipeptídica. El término abarca, sólo a modo de ejemplo, modificaciones co-traduccionales *in vivo*, modificaciones co-traduccionales *in vitro* (tal como en un sistema de traducción acelular), modificaciones postraduccionales *in vivo* y modificaciones postraduccionales *in vitro*.

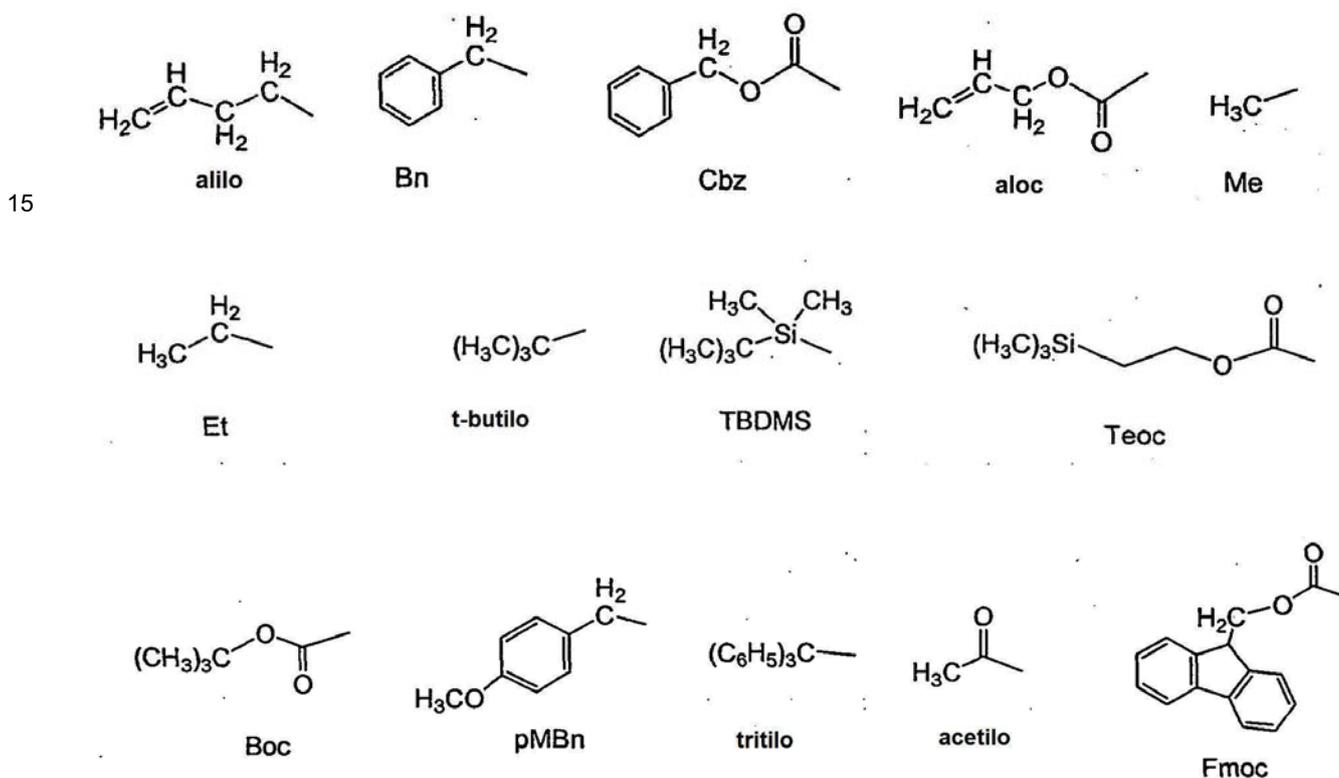
Un "profármaco" se refiere a un agente que se convierte en el fármaco parental *in vivo*. Los profármacos son a menudo útiles porque, en algunas situaciones, pueden ser más fáciles de administrar que el fármaco parental. Por ejemplo, pueden estar biodisponibles mediante administración oral, mientras que el parental no. El profármaco puede también tener mejor solubilidad en las composiciones farmacéuticas que el fármaco parental. Un profármaco incluye un derivado farmacológicamente inactivo, o de menor actividad, de un fármaco activo. Los profármacos pueden estar diseñados para modular la cantidad de un fármaco o molécula biológicamente activa que alcance un sitio de acción deseado a través de la manipulación de las propiedades de un fármaco, tal como las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas o farmacocinéticas. Los profármacos se convierten en el fármaco activo dentro del cuerpo a través de reacciones enzimáticas o no enzimáticas. Los profármacos pueden proporcionar mejores propiedades fisicoquímicas, tal como mejor solubilidad, mayores características de liberación, tal como estar específicamente dirigidos a una célula, tejido, órgano o ligando concretos, y mejor valor terapéutico del fármaco.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácido no natural (modificado) podrían administrarse a un paciente susceptible o, de otro modo, en riesgo de sufrir una enfermedad, trastorno o afección concreta. Dicha cantidad se define como una "cantidad profilácticamente eficaz". En este uso, la cantidad

precisa también depende del estado de salud del paciente, del peso y similares. Se considera bien dentro de la experiencia en la técnica la determinación de dichas cantidades profilácticamente eficaces mediante experimentación rutinaria (p. ej., un ensayo clínico de escalado de dosis).

El término protegido se refiere a la presencia de un "grupo protector" o resto que previene la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará en función del tipo de grupo químicamente reactivo que se esté protegiendo. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector se puede seleccionar del grupo de terc-butiloxycarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfuro. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo, tal como metilo, etilo o terc-butilo. Otros grupos protectores conocidos en la técnica también se pueden usar en o con los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento, incluidos grupos fotolábiles tales como Nvoc y MeNvoc.

A modo de ejemplo, los grupos de bloqueo/protectores se pueden seleccionar de:



Otros grupos protectores se describen en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999.

Una "célula huésped recombinante" o "célula huésped" se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, con independencia del procedimiento usado para inserción, por ejemplo captación directa, transducción, apareamiento f u otros procedimientos conocidos en la técnica para crear células huésped recombinantes. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o, como alternativa, puede integrarse en el genoma del huésped.

"Agente reductor" como se usa en el presente documento respecto al replegamiento de proteínas se define como cualquier compuesto o material que mantiene grupos sulfhidrilo en estado reducido y reduce los puentes disulfuro intra o intermoleculares. Agentes reductores adecuados incluyen, entre otros, ditiotreitolo (DTT), 2-mercaptoetanol, ditioeritritolo, cisteína, cisteamina (2-aminoetanol) y glutatión reducido. Una amplia variedad de agentes reductores son adecuados para usar en los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento.

"Replegamiento", como se usa en el presente documento, prescribe cualquier proceso, reacción o procedimiento que transforma el puente disulfuro que contiene polipéptidos desde un estado inadecuadamente plegado o no plegado a una conformación nativa o adecuadamente plegado con respecto a los puentes disulfuro.

La frase híbrida de forma selectiva (o específicamente) con se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula sólo con una secuencia nucleotídica concreta en condiciones de hibridación estrictas cuando dicha secuencia está presente en una mezcla compleja (incluidos, entre otros, ADN o ARN celular total o de biblioteca)-

5 La frase "condiciones estrictas de hibridación" se refiere a la hibridación de secuencias de ADN, ARN o PNA, otros miméticos de ácidos nucleicos, o combinaciones de los mismos en condiciones de fuerza iónica baja y temperatura alta como se conoce en la técnica. Normalmente, en condiciones estrictas, una sonda hibridará con su subsecuencia diana en una mezcla compleja de ácido nucleico (incluidos, entre otros, ADN o ARN celular total o de biblioteca), pero no hibrida con otras secuencias en la mezcla compleja. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas altas. En 10 Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993) se puede encontrar una extensa guía de la hibridación de ácidos nucleicos. Generalmente, las condiciones estrictas se seleccionan de aproximadamente 5-10°C menos que el punto de fusión térmica (Tf) para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos. La Tf es la temperatura (a la fuerza iónica, el pH y la concentración de ácido nucleico definidas) a la cual el 50% de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (dado que las secuencias diana están presentes en exceso, a la Tf, el 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones estrictas pueden ser aquéllas en las que la concentración de sales es inferior a aproximadamente 1,0M del ion sodio, normalmente a una concentración de ion sodio de 0,01 a 1,0M (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para las sondas cortas (incluidos, entre otros, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (incluidos, entre otros, superior a 50 nucleótidos). También se pueden alcanzar las condiciones estrictas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos dos veces la inicial, opcionalmente 10 veces la hibridación inicial. Ejemplos de condiciones estrictas de hibridación pueden ser los siguientes: 50% de formamida, 5X SSC, y 1% de SDS, incubación a 42°C, o 5X SSC, 1% de SDS, incubación a 65°C, con lavado en 0,2X SSC y 0,1% de SDS a 65°C. Tales lavados se pueden realizar durante 5, 15, 30, 60, 120, o más minutos.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, en algunas formas de realización un mamífero, y en otra forma de realización un ser humano, que es el objeto de tratamiento, observación o experimentación.

30 La expresión "sustancialmente purificado" se refiere a un polipéptido que puede ser sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con la proteína como se encuentra en su entorno natural, es decir una célula nativa o célula huésped en el caso de un polipéptido producido de forma recombinante. Un polipéptido que puede estar sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas que tienen menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, o menos de aproximadamente 1% (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando el polipéptido o variante del mismo se produce de forma recombinante en las células huésped, la proteína puede estar presente a aproximadamente 30%, aproximadamente 25%, aproximadamente 20%, aproximadamente 15%, aproximadamente 10%, aproximadamente 5%, aproximadamente 4%, aproximadamente 3%, aproximadamente 2% o aproximadamente 1% o menos del peso seco de las células. Cuando el polipéptido o variante del mismo se produce de forma recombinante en las células huésped, la proteína puede estar presente en el medio de cultivo a aproximadamente 5 g/l, aproximadamente 4 g/l, aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 2 g/l, aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 750 mg/l, aproximadamente 500 mg/l, aproximadamente 250 mg/l, aproximadamente 100 mg/l, aproximadamente 50 mg/l, aproximadamente 10 mg/l, o aproximadamente 1 mg/l o menos del peso seco de las células. Por tanto, el polipéptido "sustancialmente purificado", como se ha producido mediante los procedimientos descritos en el presente documento, puede tener un nivel de pureza de al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, específicamente, un nivel de pureza de al menos aproximadamente 75%, 80%, 85%, y más específicamente, un nivel de pureza de al menos aproximadamente 90%, un nivel de pureza de al menos aproximadamente 95%, un nivel de pureza de aproximadamente 99% o mayor, tal como se determina mediante procedimientos adecuados tales como análisis SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar.

55 El término "sustituyentes" incluye "sustituyentes que no interfiere". "Sustituyentes que no interfieren" son los grupos que dan compuestos estables. Sustituyentes o radicales que no interfieren adecuados incluyen, entre otros, halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, aralquilo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, cicloalqueno C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>, fenilo, fenilo sustituido, toluoilo, xilenilo, bifenilo, Alcoxiaralquilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alcoxiarilo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>, ariloxiaralquilo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>, oxiarilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>, alquilsulfino C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilsulfono C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sup>m</sup>-O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) en el que m es de 1 a 8, arilo, arilo sustituido, alcoxi sustituido, fluoroalquilo, radical heterocíclico, radical heterocíclico sustituido, nitroalquilo, -NO<sub>2</sub>, -CN, -NRC(O)-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), -C(O)-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), alquiltioalquilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, -C(O)O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), -OH, -SO<sub>2</sub>, =S, -COOH, -NR<sub>2</sub>,

carbonilo, -C(O)-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-CF<sub>3</sub>, -C(O)-CF<sub>3</sub>, -C(O)NR<sub>2</sub>, -(arilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-S-(arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -C(O)-(arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) en los que cada m es de 1 a 8, -C(O)NR<sub>2</sub>, -C(S)NR<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, -NRC(O)NR<sub>2</sub>, -NRC(S)NR<sub>2</sub>, sales de los mismos y similares. Cada grupo R en la lista precedente se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en H, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, o alcarilo. Cuando los grupos sustituyentes están especificados por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que serían el resultado de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo -CH<sub>2</sub>O- es equivalente a -OCH<sub>2</sub>-.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluidos los grupos a menudo denominados alquileo, alqueno, heteroalqueno, heteroalqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno y heterocicloalqueno) pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados de, entre otros: -OR, =O, =NR, =N-OR, -NR<sub>2</sub>, -SR, -halógeno, -SiR<sub>3</sub>, -OC(O)R, -C(O)R, -CO<sub>2</sub>R, -CONR<sub>2</sub>, -OC(O)NR<sub>2</sub>, -NRC(O)R, -NR-C(O)NR<sub>2</sub>, -NR(O)<sub>2</sub>R, -NR-C(NR<sub>2</sub>)=NR, -S(O)R, -S(O)<sub>2</sub>R, -S(O)<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, -NRSO<sub>2</sub>R, -CN y -NO<sub>2</sub> en un número que varía de cero (2m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. Cada grupo R en la lista precedente se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en hidrógeno, heteroalquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, incluidos arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituidos o insustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos aralquilo. Cuando dos grupos R están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, con -NR<sub>2</sub> se quiere incluir but-1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. De la discusión anterior de sustituyentes, un experto habitual en la técnica entenderá que con el término "alquilo" se quiere incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos a los grupos de hidrógeno, tales como haloalquilo (incluidos CF<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) y acilo (incluidos C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub> y -C(O)CH<sub>3</sub>).

De forma similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se varían y se seleccionan de -OR=O =NR, =N-OR, -NR<sub>2</sub>, -SR, -halógeno, -SiR<sub>3</sub>, -OC(O)R, -C(O)R, -CO<sub>2</sub>R, -CONR<sub>2</sub>, -OC(O)NR<sub>2</sub>, -NRC(O)R, -NR-C(O)NR<sub>2</sub>, -NR(O)<sub>2</sub>R, -NR-C(NR<sub>2</sub>)=NR, -S(O)R, -S(O)<sub>2</sub>R, -S(O)<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, -NRSO<sub>2</sub>R, -CN, -NO<sub>2</sub>, -R, -N<sub>3</sub>, -CH(Ph)<sub>2</sub>, fluoroalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y fluoroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas sobre el sistema de anillo aromático, y en el que cada grupo R en la lista precedente se selecciona de forma independiente de hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo y heteroarilo.

En aplicaciones terapéuticas, las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácidos no naturales (modificado) se administran a un paciente ya afectado por la enfermedad, afección o trastorno concretos, en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad, afección o trastorno. Dicha cantidad se define como una "cantidad terapéuticamente eficaz" y dependerá de la gravedad y evolución de la enfermedad, trastorno o afección, la terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos y el criterio del médico encargado del tratamiento. Se considera bien dentro de la experiencia en la técnica la determinación de dichas cantidades terapéuticamente eficaces mediante experimentación rutinaria (p. ej., un ensayo clínico de escalado de dosis).

El término "tratar" se usa para hacer referencia a tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

Como se usa en el presente documento, el término "polímero hidrosoluble" se refiere a cualquier polímero que es soluble en disolventes acuosos. La unión de polímeros hidrosolubles a un polipéptido puede tener como resultado cambios, incluidos, entre otros, aumento o modulación de la semivida en suero, o aumento o modulación de la semivida terapéutica respecto a la forma no modificada, inmunogenicidad modulada, características de asociación físicas moduladas, tales como agregación y formación de multímeros, unión alterada al receptor, unión alterada a una o más parejas de unión y dimerización o multimerización alterada del receptor. El polímero hidrosoluble puede o no tener su propia actividad biológica. Polímeros adecuados incluyen, entre otros, polietilenglicol, polietilenglicol propionaldehído, mono alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o derivados arilo del mismo (descrito en la patente de EE.UU. nº 5.252.714, que se incorpora por referencia en el presente documento), monometoxi-polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliaminoácidos, anhídrido diviniléter maleico, N-(2-hidroxipropil)metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano, incluidos sulfato de dextrano, polipropilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioli polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glicanos, celulosa y derivados de celulosa, incluidos, entre otros, metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y derivados del mismo, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de los mismos, poliviniléteres y alfa-beta-poli(2-hidroxietil)-DL-aspartamida y similares, o mezclas de los mismos. Ejemplos de dichos polímeros hidrosolubles incluyen polietilenglicol y seroalbúmina. En algunas formas de realización, el polímero hidrosoluble comprende un resto de poli(etilenglicol). El peso molecular del polímero puede ser de una amplia gama, incluidos entre 100 Da y 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede estar entre 100 Da y 100.000 Da, incluyendo 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, y 100 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero puede estar entre 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el

- peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado. El peso molecular del PEG de cadena ramificada puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluidos, entre otros, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, y 1.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da.
- 15 A menos que se indique lo contrario, se emplean procedimientos convencionales de espectroscopia de masas, RMN, HPCL, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica.
- Compuestos (incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos mencionados con anterioridad) presentados en el presente documento incluyen compuestos marcados isotópicamente, que son idénticos a los citados en las diversas fórmulas y estructuras presentadas en el presente documento, excepto por el hecho de que uno o más átomos pueden sustituirse con un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico más habitual en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en los presentes compuestos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ , respectivamente. Ciertos compuestos marcados isotópicamente descritos en el presente documento, por ejemplo aquéllos en los que se incorporan isótopos radioactivos tales como  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , son útiles en los ensayos de distribución tisular de fármacos y/o sustratos. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es *decir*,  $^2\text{H}$ , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, incremento de la semivida *in vivo* o reducción de los requisitos de dosificación.
- 30 Algunos de los compuestos del presente documento (incluidos aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos mencionados con anterioridad) tienen átomos de carbono asimétricos y, por tanto, pueden existir como enantiómeros o diaestereómeros. Las mezclas diaestereoméricas se pueden separar en sus diaestereómeros individuales sobre la base de sus diferencias físico-químicas mediante procedimientos conocidos, tal como mediante cromatografía y/o cristalización fraccionada. Los enantiómeros se pueden separar convirtiendo la mezcla enantiomérica en una mezcla diaestereomérica mediante la reacción con un compuesto adecuado ópticamente activo (p. ej., un alcohol), separando los diaestereómeros y convirtiendo (p. ej., hidrolizando) los diaestereómeros individuales en los correspondientes enantiómeros puros. Todos estos isómeros, incluidos los diaestereómeros, enantiómeros y mezclas de los mismos, se consideran parte de las composiciones descritas en el presente documento.
- 40 En otras formas de realización o formas de realización adicionales, los compuestos descritos en el presente documento (incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos mencionados con anterioridad) se metabolizan tras la administración a un organismo que lo necesite para producir un metabolito que después se usa para producir un efecto deseado, incluido un efecto terapéutico. En otras formas de realización o formas de realización adicionales están metabolitos activos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados).
- Los procedimientos y formulaciones descritos en el presente documento incluyen el uso de N-óxidos, formas cristalinas (también conocidas como polimorfos) o sales farmacéuticamente aceptables de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados). En algunas situaciones, los aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) pueden existir en forma de tautómeros. Todos los tautómeros están incluidos dentro del ámbito de los aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) presentados en el presente documento. Además, los aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) descritos en el presente documento pueden existir en formas no solvatadas así como solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, etanol y similares. Las formas solvatadas de los aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) presentados en el presente documento también se consideran divulgadas en el presente documento.

Los expertos en la técnica reconocerán que algunos de los compuestos del presente documento (incluidos aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos mencionados con anterioridad) pueden existir en varias formas tautoméricas. Todas estas formas

tautoméricas se consideran parte de las composiciones descritas en el presente documento. Asimismo, por ejemplo, todas las formas enol-ceto de todos los compuestos (incluidos aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos mencionados con anterioridad) se consideran parte de las composiciones descritas en el presente documento.

- 5 Algunos de los compuestos del presente documento (incluidos aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos mencionados con anterioridad) son ácidos y pueden formar una sal con un catión farmacéuticamente aceptable. Algunos de los compuestos del presente documento (incluidos aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos mencionados con anterioridad) pueden ser básicos y, en consecuencia, pueden formar una sal con un anión farmacéuticamente aceptable. Todas estas sales, incluidas las disales, están dentro del alcance de las composiciones descritas en el presente documento y se pueden preparar mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, se pueden preparar sales poniendo en contacto las entidades ácidas y básicas en un medio acuoso, no acuoso o parcialmente acuoso. Las sales se recuperan usando al menos una de las técnicas siguientes: filtración, precipitación con un no disolvente seguido de filtración, evaporación del disolvente o, en el caso de las soluciones acuosas, liofilización.

Por ejemplo, las sales incluyen: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanosulfónico, ácido 2-hidroetanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-metilbicyclo-[2.2.2]oct-2-en-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 4,4'-metilénbis-(3-hidroxi-2-en-2-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto parental se reemplaza con un ion metálico, por ejemplo un ion de metal alcalino, un ion de metal alcalinotérreo; o se coordina con una base orgánica. Bases orgánicas aceptables incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares. Bases inorgánicas aceptables incluyen hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido potásico, carbonato sódico, hidróxido sódico y similares.

- 30 Debe entenderse que una referencia a una sal incluye las formas de adición de disolvente o formas cristalinas de las mismas, particularmente solvatos o polimorfos. Los solvatos contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de un disolvente y a menudo se forman durante el procedimiento de cristalización. Se forman hidratos cuando el disolvente es agua o se forman alcoholatos cuando el disolvente es alcohol. Los polimorfos incluyen las diferentes disposiciones de empaquetamiento en cristal de la misma composición elemental de un compuesto.
- 35 Normalmente, los polimorfos tienen diferentes patrones de difracción en rayos X, espectros en infrarrojos, puntos de ebullición, densidad, dureza, forma del cristal, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. Varios factores tales como el disolvente de recristalización, la tasa de cristalización y la temperatura de almacenamiento pueden producir que una forma en cristal sencillo domine.

#### **Breve descripción de las figuras**

- 40 Puede obtenerse una mejor comprensión de las características y ventajas de los presentes procedimientos y composiciones por referencia a la siguiente descripción detallada que expone formas de realización ilustrativas, en las que se usan los principios de los procedimientos, composiciones, dispositivos y aparatos de los inventores y sus figuras adjuntas.

45 La FIG. 1 presenta una representación esquemática de la relación de ciertos aspectos de los procedimientos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en el presente documento.

La FIG. 2 presenta un ejemplo no limitante de un análisis SDS-PAGE de reacciones de dimerización de una etapa de scFv 108 usando un enlazador de hidroxilamina PEG homobifuncional de 2 K con diferentes proporciones molares: 1) scFv:enlazador = 1.6:1, con hidrazida acética; 2) scFv:enlazador = 2:1, con hidrazida acética; 3) scFv:enlazador = 2.4:1, con hidrazida acética; 4) scFv:enlazador = 2:1, sin hidrazida acética; 5) scFv:enlazador = 2:1, con hidrazida acética sin enlazador PEG.

La FIG. 3 presenta un ejemplo no limitante de un análisis SDS-PAGE de scFv-pAcF y conjugación de monohidroxilamina PEG 30 K 1) el habitual de 100% scFv-pAcF de partida; 2) el habitual de 20% de scFv-pAcF de partida; 3) el habitual de 10% de scFv-pAcF de partida; 4) scFv:PEG = 1:3 con hidrazida acética 20 mM; 5) scFv:PEG = 1:3 sin hidrazida acética; 6) scFv:PEG = 1:5 con hidrazida acética 20 mM; 7) scFv:PEG = 1:5 sin hidrazida acética.

55 La FIG. 4 presenta un ejemplo no limitante de un análisis SDS-PAGE de scFv-pAcF y conjugación de monohidroxilamina PEG 30 K con diferentes concentraciones de hidrazida acética. 1) scFv:enlazador = 1:2, hidrazida

acética 5 mM; 2) scFv-pAcF:PEG = 1:2, con hidrazida acética 20 mM; 3) scFv-pAcF:PEG 1:2, hidrazida acética 80 mM; 4) scFv-pAcF:PEG = 1:5, sin hidrazida acética; 5) el habitual de 10% de scFv-pAcF; 6) el habitual de 20% de scFv-pAcF; 7) el habitual de 100% de scFv-pAcF.

5 La FIG.5 presenta ejemplos no limitantes de aceleradores que se pueden usar en los procedimientos, reacciones y síntesis descritos en el presente documento.

La FIG. 6 presenta un ejemplo no limitante de un análisis SDS-PAGE de comparación de la formación de oxima en presencia de diferentes aceleradores; el número de calle corresponde al número de acelerador en la FIG. 5 y la última calle es una reacción control sin acelerador.

10 La FIG. 7 presenta un ejemplo no limitante de un análisis SDS-PAGE de la conjugación de hGH-pAcF con monohidroxilamina PEG 30 K con los aceleradores 7 y 20: 1) hGH-pAcF:PEG = 1:2 con el acelerador 7; 2) hGH-pAcF:PEG = 1:2 con el acelerador 20; 3) hGH-pAcF:PEG = 1:2 sin acelerador; 4) hGH-pAcF:PEG = 1:5 sin acelerador.

La FIG. 8 presenta un ejemplo no limitante de un análisis CLEM de hGH incubada con diferentes concentraciones del acelerador hidrazida acética. A) trazo total de la CLEM; B) Espectro de masas de hGH sin acelerador; C) Espectro de masas de hGH con el acelerador hidrazida acética 200 mM.

15 La FIG.9 presenta ejemplos no limitantes de aceleradores que se pueden usar en los procedimientos, reacciones y síntesis descritos en el presente documento.

La FIG. 10a presenta una reacción no limitante de una cetona modelo con una hidroxilamina modelo en presencia de un acelerador para formar una oxima modelo; la FIG. 10b presenta ejemplos no limitantes de aceleradores que se pueden usar en los procedimientos, reacciones y síntesis descritos en el presente documento.

20 La FIG. 11 presenta un conjunto no limitante de rendimientos de oxima para una reacción modelo en ausencia y en presencia de varios aceleradores descritos en el presente documento.

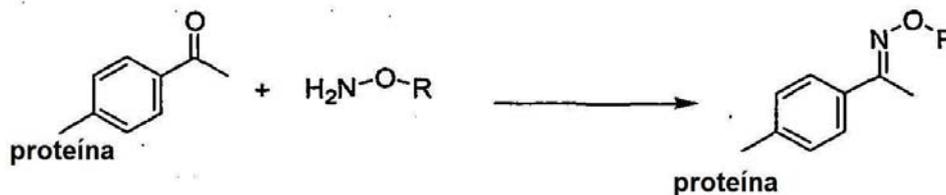
### **Descripción detallada de la invención**

#### ***I. Introducción***

25 Recientemente se ha notificado una tecnología enteramente nueva en las ciencias de las proteínas, que promete superar muchas de las limitaciones asociadas con las modificaciones específicas de sitio de las proteínas. Específicamente, se han añadido nuevos componentes a la maquinaria de biosíntesis de proteínas de la procarionota *Escherichia coli* (*E. coli*) (p. ej., L. Wang, y col., (2001), *Science* 292:498-500) y la eucariota *Saccharomyces cerevisiae* (**S. cerevisiae**) (p. ej., J. Chin y col., *Science* 301: 964-7 (2003)), que ha permitido la incorporación de aminoácidos no naturales a las proteínas *in vivo*. Una serie de aminoácidos nuevos con nuevas propiedades químicas, físicas o biológicas, incluidos marcadores de fotoafinidad y aminoácidos fotoisomerizables, aminoácidos de fotoreticulación (véase, p. ej., Chin, J.W., y col. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 11020-11024; and Chin, J.W., y col. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-27); cetoaminoácidos y aminoácidos glicosilados se ha incorporado con eficiencia y con alta fidelidad en proteínas en *E. coli* y en levaduras en respuesta al codón ámbar, TAG, usando esta metodología. Véase, por ejemplo, J. W. Chin y col., (2002), *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-902; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), *ChemBioChem* 3(11):1135-1137; J. W. Chin, y col., (2002), *PNAS United States of America* 99:11020-11024; y, L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1:1-11. En estos estudios se ha demostrado que es introducir de forma selectiva grupos químicos funcionales que no se encuentran en las proteínas, que son químicamente inertes para todos los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente (es decir, aminoácidos "naturales") y que pueden usarse para que reaccionen de forma eficiente y selectiva para formar enlaces covalentes estables.

40 Los grupos funcionales químicos que no se encuentran en los aminoácidos naturales incluyen grupos carbonilo, tales como cetonas y aldehídos, y grupos hidroxilamina. Un resto de hidroxilamina reacciona con un grupo carbonilo tal como una cetona o un aldehído para formar una oxima relativamente estable; por tanto, este apareamiento (hidroxilamina con un grupo carbonilo) proporciona un medio para funcionalizar adicionalmente polipéptidos de aminoácidos no naturales. Un ejemplo de dicho apareamiento se muestra a continuación:

45



Por ejemplo, cuando un resto de hidroxilamina o un grupo carbonilo se incorpora en un polipéptido de aminoácidos no naturales y se hace reaccionar con un reactivo que contiene dicho otro miembro del par, el polipéptido de aminoácidos no naturales se puede funcionalizar con el reactivo a través de la formación de un grupo oxima. Aunque compatible para reacciones de funcionalización de proteínas, la reacción estándar de formación de oxima se puede convertir en más eficiente, lo que permitiría, por ejemplo, el uso de cantidades menores de reactantes y reduciría el tiempo hasta la finalización de la reacción. Por tanto, el desarrollo de un acelerador es altamente deseable.

## II. Visión general

La figura 1 es una forma de realización de las composiciones, procedimientos y técnicas que se describen en el presente documento. Se selecciona un compuesto que contiene carbonilo para la reacción con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima. El compuesto que contiene carbonilo incluye aminoácidos no naturales, polipéptidos, oligonucleótidos, polímeros (incluidos, sólo a modo de ejemplo, polietilenglicol), reactivos, grupos enlazadores, grupos que comprenden otra funcionalidad y combinaciones de los mismos; la presente divulgación proporciona numerosos ejemplos de grupos que comprenden otra funcionalidad. El compuesto que contiene hidroxilamina incluye aminoácidos no naturales, polipéptidos, oligonucleótidos, polímeros (incluidos, a modo de ejemplo, polietilenglicol), reactivos, grupos enlazadores, grupos que comprenden otra funcionalidad y combinaciones de los mismos; la presente divulgación proporciona numerosos ejemplos de grupos que comprenden otra funcionalidad. El compuesto que contiene oxima incluye aminoácidos no naturales, polipéptidos, oligonucleótidos, polímeros (incluidos, sólo a modo de ejemplo, polietilenglicol), reactivos, grupos enlazadores, grupos que comprenden otra funcionalidad y combinaciones de los mismos; la presente divulgación proporciona numerosos ejemplos de grupos que comprenden otra funcionalidad. A la mezcla de reacción del compuesto que contiene hidroxilamina y el compuesto que contiene carbonilo se añade un acelerador, en el que el acelerador tiene al menos una de las propiedades siguientes: (a) incrementa la velocidad de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que el incremento de la velocidad es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (b) disminuye la energía de activación de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la energía de activación es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (c) incrementa el rendimiento de un compuesto que contiene oxima de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina, en el que el incremento del rendimiento es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (d) disminuye la temperatura a la cual un compuesto que contiene carbonilo reacciona con compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la temperatura es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (e) disminuye el tiempo necesario para reaccionar un compuesto que contiene carbonilo reacciona con compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución del tiempo es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (f) disminuye la cantidad de reactivos necesaria para formar un compuesto oxima en un polipéptido de aminoácidos no naturales, en el que la disminución de la cantidad de reactivos es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (g) disminuye los productos secundarios resultantes de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de los productos secundarios es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (h) no destruye de forma irreversible la estructura terciaria de un polipéptido sometido a una reacción de formación de oxima en presencia de un acelerador (a excepción de, por supuesto, cuando el fin de la reacción es destruir dicha estructura terciaria); (i) se puede separar de un compuesto que contiene oxima *al vacío*; y (j) modula la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina. En una forma de realización adicional, el acelerador no tiene ninguna de las propiedades mencionadas con anterioridad. Opcionalmente se someten a ensayo varios aceleradores descritos en el presente documento y se selecciona un acelerador en base a su posesión de al menos una de las propiedades mencionadas con anterioridad. Opcionalmente, las características de reacción (p. ej., rendimiento de compuesto que contiene oxima) pueden optimizarse adicionalmente mediante al menos uno de los siguientes: (a) variar la cantidad de acelerador, (b) variar la cantidad de compuesto que contiene carbonilo, (c) variar la cantidad de compuesto que contiene hidroxilamina, (d) variar la temperatura de la reacción, (e) variar el pH de la reacción y (f) variar el disolvente de la mezcla de reacción. Opcionalmente, se someten a ensayo aceleradores adicionales en una condición de reacción optimizada o se invierten las etapas de selección y optimización o las etapas de selección y

optimización se repiten de un modo reiterativo. El compuesto que contiene carbonilo y el compuesto que contiene hidroxilamina se hacen reaccionar en presencia del acelerador para formar el compuesto que contiene oxima. Opcionalmente, el progreso de la reacción se monitoriza a través de un medio de detección, incluida, a modo de ejemplo, la cromatografía. El compuesto que contiene oxima resultante de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina en presencia de un acelerador puede opcionalmente aislarse, purificarse y caracterizarse. El acelerador se puede eliminar del compuesto que contiene oxima mediante varios procedimientos, incluidos, sólo a modo de ejemplo, filtración, técnicas *al vacío*, cromatografía, bioseparación basada en membrana, electroforesis, precipitación del compuesto que contiene oxima, destilación o una combinación de los mismos. Por tanto, en una forma de realización descrita en el presente documento, los aceleradores se pueden retirar al vacío del material que contiene oxima; no obstante, en otras formas de realización descritas en el presente documento, los aceleradores se pueden retirar usando cualquiera (o cualquier combinación) de los procedimientos mencionados con anterioridad. Aislamiento y purificación significa la eliminación de al menos algún compuesto que no contiene oxima de los materiales en la mezcla de reacción.

A un nivel, en el presente documento se describen las herramientas (procedimientos, composiciones, técnicas) para crear y usar un polipéptido que comprende al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con un grupo oxima formado en presencia de un acelerador (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). Dichos aminoácidos no naturales pueden contener otra funcionalidad, incluida una funcionalidad deseada.

También se describen en el presente documento aminoácidos no naturales que tienen o que se pueden modificar para que contengan un resto de oxima formada en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En este aspecto se incluyen procedimientos para producir, purificar, caracterizar y usar dichos aminoácidos no naturales. En otro aspecto descrito en el presente documento hay procedimientos, estrategias y técnicas para incorporar en un polipéptido al menos uno de dichos aminoácidos no naturales. En este aspecto también se incluyen procedimientos para producir, purificar, caracterizar y usar dichos polipéptidos que contienen al menos uno de dichos aminoácidos no naturales. También se incluyen en este aspecto composiciones y procedimientos para producir, purificar, caracterizar y usar A un polinucleótidos (incluidos ADN y ARNI que se pueden usar para producir, al menos en parte, un polipéptido que contiene al menos un aminoácido no natural que puede reaccionar, en presencia de un acelerador (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento) para formar un polipéptido de aminoácidos no naturales que contienen oxima, incluido un polipéptido que se haya modificado. En este aspecto también se incluyen composiciones y procedimientos para producir, purificar, caracterizar y usar células que pueden expresar dichos polipéptidos que se pueden usar para producir, al menos en parte, un polipéptido que contiene al menos un aminoácido no natural.

También se incluyen dentro del alcance de los procedimientos, composiciones, estrategias y técnicas descritos en el presente documento aceleradores para hacer reaccionar un reactivo con un aminoácido no natural (que contiene un grupo carbonilo o dicarbonilo, un grupo hidroxilamina o formas protegidas de los mismos) que es parte de un polipéptido de modo que se produzcan alguna de las modificaciones postraduccionales mencionadas con anterioridad. En general, el polipéptido de aminoácidos no naturales modificado postraduccionalmente resultante contendrá al menos un grupo oxima; el polipéptido de aminoácidos no naturales modificado que contiene oxima puede someterse a reacciones de modificación posteriores. En este aspecto también se incluyen procedimientos para seleccionar, producir, optimizar, purificar, caracterizar y usar dichos aceleradores que se pueden usar con cualquier modificación postraduccionales de dicho(s) aminoácido(s) no natural(es).

El polipéptido que contiene aminoácidos no naturales puede contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, o diez o más aminoácidos no naturales que contienen un grupo oxima (o formas protegidas o enmascaradas de los mismos), en el que se produjo al menos un grupo oxima en presencia de los aceleradores descritos en el presente documento, y, además, dicho polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene oxima puede contener, opcionalmente, al menos un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene un grupo carbonilo o dicarbonilo, un grupo hidroxilamina o formas protegidas de los mismos. Los aminoácidos no naturales pueden ser iguales o diferentes, por ejemplo puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más sitios diferentes en la proteína que comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos no naturales diferentes. En ciertas formas de realización, al menos uno, pero menos que todos, de un aminoácido concreto presente en una versión natural de la proteína está sustituido con un aminoácido no natural.

Los procedimientos y composiciones de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento proporcionan conjugados de sustancias que tienen una amplia variedad de grupos funcionales (siempre que al menos un conjugado esté químicamente unido a un aminoácido no natural a través de un grupo oxima formado en presencia de los aceleradores descritos en el presente documento), sustituyentes o restos, con otras sustancias, incluida, entre otras, una funcionalidad deseada.

En otro aspecto de las composiciones, procedimientos, técnicas y estrategias descritos en el presente documento están los procedimientos para estudiar o usar cualquiera de los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) mencionados con anterioridad. En este aspecto se incluyen, a modo de ejemplo, la producción terapéutica, diagnóstica, en base a ensayos, industrial, cosmética, de biología vegetal, ambiental, producción de energía y/o usos militares que se beneficiarían de un polipéptido que comprende un polipéptido o proteína de aminoácidos no naturales (modificado).

### **III. Modificaciones postraduccionales de componentes de aminoácidos no naturales de un polipéptido en presencia de al menos un acelerador**

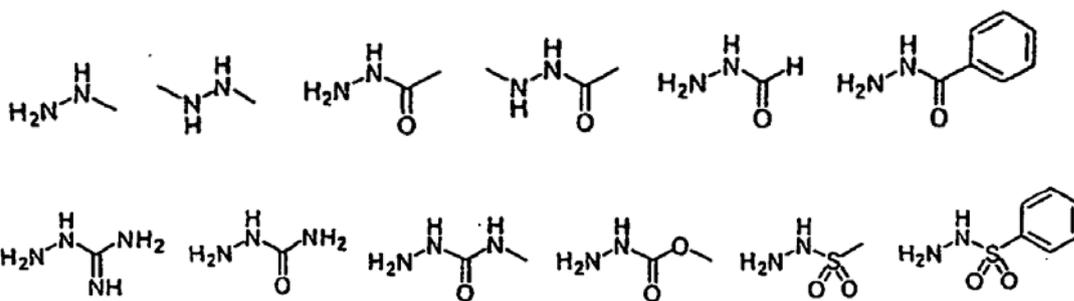
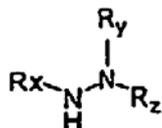
Se han desarrollado composiciones, técnicas y estrategias para la incorporación específica de sitio de aminoácidos no naturales durante la traducción *in vivo* de proteínas. Incorporando un aminoácido no natural con una química de cadena lateral que es ortogonal con la de los aminoácidos naturales, esta tecnología posibilita la obtención mediante derivación específica de sitio de proteínas recombinantes. Como resultado, una ventaja fundamental de los procedimientos, composiciones, técnicas y estrategias descritos en el presente documento es que las proteínas obtenidas mediante derivación se pueden preparar ahora como productos homogéneos definidos. No obstante, los procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, técnicas y estrategias descritos en el presente documento que implican un acelerador no están limitados a polipéptidos de aminoácidos no naturales formados mediante técnicas de traducción *in vivo* de proteínas, sino que incluyen polipéptidos de aminoácidos no naturales formados mediante cualquier técnica, incluidas, solo a modo de ejemplo, unión de proteínas expresadas, síntesis química, técnicas basadas en ribozimas (Véase, por ejemplo, la sección del presente documento titulada "Expresión en sistemas alternativos"). Por comodidad, la frase "modificación postraducciona", cuando está dirigida al uso de un acelerador para formar un enlace oxima en un polipéptido de aminoácidos no naturales, incluye polipéptidos de aminoácidos no naturales formados mediante cualquier técnica, incluida cualquier técnica *in vivo* e *in vitro*, tales como las descritas en el presente documento y conocidas por los expertos habituales en la técnica.

La capacidad para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas recombinantes expande ampliamente las químicas que pueden implementarse para derivación. Más específicamente, la derivación de proteínas para formar un enlace oxima en una porción de aminoácido no natural de un polipéptido ofrece varias ventajas. En primer lugar, los aminoácidos naturales, en general, no forman enlaces oxima y, por tanto, los reactivos diseñados para formar enlaces oxima reaccionarán de forma específica de sitio con el componente aminoácido no natural del polipéptido (suponiendo, por supuesto, que el aminoácido no natural y el correspondiente reactivo se hayan diseñado para formar un enlace oxima), por tanto, la capacidad para obtener proteínas mediante derivación de forma selectiva de sitio proporciona un único producto homogéneo en oposición a las mezclas de proteínas obtenidas por derivación producidas usando la tecnología de la técnica anterior. En segundo lugar, los aductos de oxima son estables en condiciones biológicas, lo que sugiere que las proteínas obtenidas por derivación mediante intercambio de oxima son candidatos válidos para aplicaciones terapéuticas. En tercer lugar, la estabilidad del enlace oxima resultante se puede manipular en base a la identidad (es decir, los grupos funcionales y/o la estructura) del aminoácido no natural en el que se ha formado el enlace oxima. Por tanto, en algunas formas de realización, el enlace oxima del polipéptido de aminoácidos no naturales tiene una semivida de descomposición inferior a una hora, en otras formas de realización inferior a 1 día, en otras formas de realización inferior a 2 días, en otras formas de realización inferior a 1 semana y en otras formas de realización más de 1 semana. En otras formas de realización más, la oxima resultante es estable durante al menos dos semanas en condiciones levemente ácidas, en otras formas de realización la oxima resultante es estable durante al menos 5 días en condiciones levemente ácidas. En otras formas de realización, el polipéptido de aminoácidos no naturales es estable durante al menos 2 días a un pH entre aproximadamente 2 y 8; en otras formas de realización, en un pH entre aproximadamente 2 a 6; formas de realización, en un pH entre aproximadamente 2 a 4. En otras formas de realización, usando las estrategias, procedimientos, composiciones y técnicas descritos en el presente documento, un experto habitual en la técnica podrá sintetizar un enlace oxima en un polipéptido de aminoácido no natural con una semivida de descomposición ajustada a las necesidades de dicho experto (p. ej., un uso terapéutico tal como la liberación sostenida, o un uso diagnóstico o un uso industrial o un uso militar).

La formación de un aminoácido no natural que contiene oxima o un polipéptido de un aminoácido no natural a partir de la reacción de (a) un aminoácido no natural que contiene carbonilo o un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene carbonilo y un reactivo que contiene hidroxilamina, o (b) un aminoácido no natural que contiene hidroxilamina o un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene hidroxilamina y un reactivo que contiene carbonilo, se puede potenciar mediante la adición de un acelerador a la mezcla de reacción. Un acelerador es un compuesto que tiene al menos una de las propiedades siguientes: (a) incrementa la velocidad de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que el incremento de la velocidad es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (b) disminuye la energía de activación de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la energía de activación es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (c) incrementa el rendimiento de un compuesto que contiene oxima de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina, en el que el incremento del

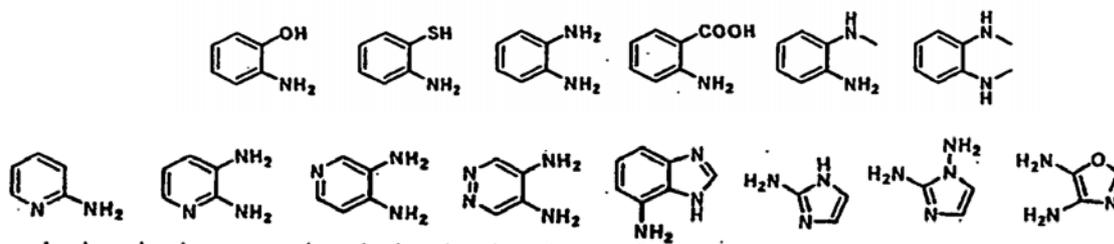
rendimiento es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (d) disminuye la temperatura a la cual un compuesto que contiene carbonilo reacciona con compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la temperatura es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (e) disminuye el tiempo necesario para reaccionar un compuesto que contiene carbonilo reacciona con compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución del tiempo es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (f) disminuye la cantidad de reactivos necesaria para formar un compuesto oxima en un polipéptido de aminoácidos no naturales, en el que la disminución de la cantidad de reactivos es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (g) disminuye los productos secundarios resultantes de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de los productos secundarios es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (h) no destruye de forma irreversible la estructura terciaria de un polipéptido sometido a una reacción de formación de oxima en presencia de un acelerador (a excepción de, por supuesto, cuando el fin de la reacción es destruir dicha estructura terciaria); (i) se puede separar de un compuesto que contiene oxima *al vacío*; y (j) modula la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina. En otras formas de realización, el acelerador tiene al menos dos de las propiedades mencionadas con anterioridad, tres de las propiedades mencionadas con anterioridad, cuatro de las propiedades mencionadas con anterioridad, cinco de las propiedades mencionadas con anterioridad, seis de las propiedades mencionadas con anterioridad, siete de las propiedades mencionadas con anterioridad, ocho de las propiedades mencionadas con anterioridad, nueve de las propiedades mencionadas con anterioridad o todas las propiedades mencionadas con anterioridad. En una forma de realización adicional, el acelerador no tiene ninguna de las propiedades mencionadas con anterioridad.

El uso de un acelerador incluye el uso de un único acelerador o múltiples aceleradores. Además, la proporción molar entre el acelerador y el compuesto que contiene carbonilo incluye valores entre aproximadamente 0,5:1 a 5000:1, incluidos, únicamente a modo de ejemplo, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, y 0,5:1. Además, la proporción molar entre el acelerador y el compuesto que contiene hidroxilamina incluye valores entre aproximadamente 0,5:1 a 5000:1, incluidos, solo a modo de ejemplo, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, y 0,5:1. Además, el acelerador incluye compuestos que sustancialmente se pueden eliminar *al vacío* del compuesto que contiene oxima resultante. Además, el acelerador incluye compuestos que contienen un resto de diamina, un resto de semicarbazida, una hidrazina o un resto de hidrazida. Además, en cualquiera de los aspectos o formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador se selecciona del grupo que consiste en aminas aromáticas bifuncionales, derivados de oxoamina y compuestos que tienen las estructuras siguientes:



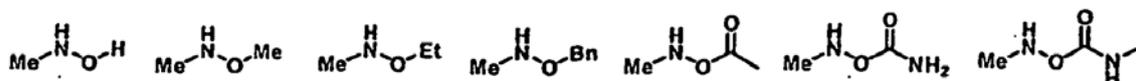
en las que  $R_x$ ,  $R_y$  y  $R_z$  se seleccionan del grupo que consiste en:  $L_x$ -H,  $L_x$ -alquilo,  $L_x$ -arilo,  $L_x$ -heteroarilo,  $L_x$ -alquenido,  $L_x$ -alquinilo,  $L_x$ -alcoxi y  $L_x$ -alquilamina, en los que  $L_x$  es un enlace, C(=O), C(=NH) y C(=NH)-NH y SO, SO<sub>2</sub>, en los que la amina aromática se selecciona del grupo:

**Aminas aromáticas bifuncionales:**



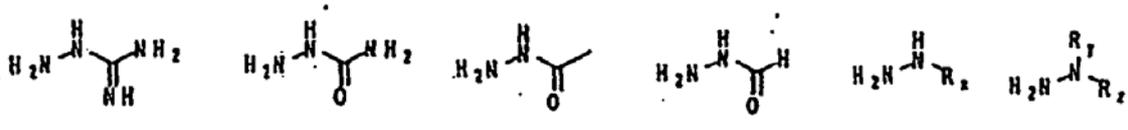
y en la que el derivado de oxoamina se selecciona del grupo:

**Derivados de oxoamina:**



5

Además, el acelerador incluye compuestos seleccionados del grupo que consiste en:



10 en la que  $R_x$ ,  $R_y$  y  $R_z$  se seleccionan del grupo que consiste en:  $L_x$ -H,  $L_x$ -alquilo,  $L_x$ -arilo,  $L_x$ -heteroarilo,  $L_x$ -alquenilo,  $L_x$ -alquinilo,  $L_x$ -alcoxi y  $L_x$ -alquilamina, en los que  $L_x$  es un enlace, C(=O), C(=NH) y C(=NH)-NH. Además, en cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador se selecciona de los compuestos presentados en las FIG. 5, FIG. 9 o FIG. 10, incluidos, a modo de ejemplo, cualquiera de los compuestos 6, 8, 10, 7 y 20 de la Figura 5. En cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador incluye un agente que puede formar una hidrazona tras la reacción con un grupo que contiene carbonilo. Además, en cualquiera de los aspectos mencionados con anterioridad, la actividad del acelerador depende de la velocidad de la reacción con el resto de cetona y la estabilidad del intermedio resultante. Además, en cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el pH de la mezcla de reacción que comprende el acelerador, el compuesto que contiene carbonilo y el compuesto que contiene hidroxilamina está entre aproximadamente 2,0 y 10; entre aproximadamente 2,0 y 9,0; entre aproximadamente 2,0 y 8,0; entre aproximadamente 3,0 y 7,0; entre aproximadamente 4,0 y 6,0; entre 3,0 y 10,0; entre aproximadamente 4,0 y 10,0; entre aproximadamente 3,0 y 9,0; entre aproximadamente 3,0 y 8,0; entre aproximadamente 2,0 y 7,0; entre aproximadamente 3,0 y 6,0; entre aproximadamente 4,0 y 9,0; entre aproximadamente 4,0 y 8,0; entre aproximadamente 4,0 y 7,0; entre aproximadamente 4,0 y 6,5; entre aproximadamente 4,5 y 6,5; aproximadamente 4,0; aproximadamente 4,5; aproximadamente 5,0; aproximadamente 5,5; aproximadamente 6,0; aproximadamente 6,5; y aproximadamente 7,0.

15 Los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos con anterioridad son útiles para, entre los que incluyen terapéuticos, diagnósticos, enzimas catalizadoras, enzimas catalizadoras, enzimas industriales, proteínas de unión (incluidos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo), e, incluidos, entre otros, el estudio de la estructura y la función de las proteínas. Véase, por ejemplo, Dougherty, (2000) Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology, 4:645-652. Otros usos para los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos con anterioridad incluyen, solo a modo de ejemplo, usos basados en ensayos, cosméticos, biología vegetal, ambientales, producción de energía y/o militares. No obstante, los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos con anterioridad pueden sufrir otras modificaciones de modo que puedan incorporar funcionalidades nuevas o modificadas, incluida la manipulación de la eficacia terapéutica del polipéptido, mejorando el perfil de seguridad del polipéptido, ajustando la farmacocinética, la farmacología y/o la farmacodinámica del polipéptido (p. ej., incremento de la solubilidad en agua, biodisponibilidad, incremento de la semivida en suero, incremento de la semivida terapéutica, modulación de la inmunogenicidad, modulación de la actividad biológica o extensión del tiempo de circulación), proporcionando la funcionalidad adicional al polipéptido, incorporando un indicador, marcador o señal detectable en el polipéptido, facilitando las propiedades de aislamiento del polipéptido y cualquier combinación de las modificaciones mencionadas con anterioridad.

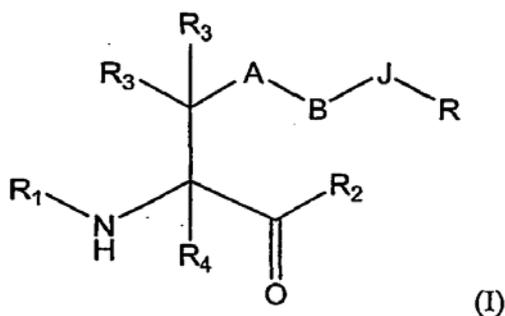
20 Los procedimientos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en el presente documento no se limitan a un tipo, clase o familia concretas de polipéptidos o proteínas. De hecho, casi todos los polipéptidos pueden incluir al menos un aminoácido no natural descrito en el presente documento. A modo de ejemplo, el polipéptido puede ser homólogo a una proteína terapéutica seleccionada del grupo que consiste en: alfa-1-antitripsina, angiostatina, factor antihemolítico, anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, apolipoproteína, apoproteína, factor natriurético auricular, polipéptido natriurético,

péptido atrial, quimioquina C-X-C, T39765, NAP-2, ENA-78, gro-a, gro-b, gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG, calcitonina, ligando c-kit, citoquina, CC quimioquina, proteína 1 quimioattractiva de monocitos, proteína-2 quimioattractiva de monocitos, proteína-3 quimioattractiva de monocitos, proteína 1 alfa inflamatoria de monocitos, proteína 1 beta inflamatoria de monocitos, RANTES, 1309, R83915, R91733, HCCI, T58847, D31065, T64262, CD40, ligando CD40, ligando c-kit, colágeno, factor estimulante de colonias (CSF), factor del complemento 5a, inhibidor del complemento, receptor del complemento 1, citoquina, péptido 78 epitelial activador de neutrófilos, MIP-16, MCP-1, factor de crecimiento epidérmico (EGF), péptido epitelial activador de neutrófilos, eritropoyetina (EPO), toxina exfoliante, Factor IX, Factor VII, Factor VIII, Factor X, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), fibrinógeno, fibronectina, proteína del haz de cuatro hélices, GCSF, glp-1, GM-CSF, glucocerebrosidasa, gonadotropina, factor de crecimiento, receptor del factor de crecimiento, grf, proteína hedgehog, hemoglobina, factor de crecimiento de hepatocitos (hGF), hirudina, hormona de crecimiento humana (hGH), seroalbúmina humana, ICAM-1, receptor de ICAM-1, LFA-1, receptor de LFA-1, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), IGF-I, IGF-II, interferón (IFN), IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, cualquier molécula similar al interferón o miembro de la familia de los IFN, interleucina (IL), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), lactoferrina, factor inhibidor de leucemia, luciferasa, neurturina, factor inhibidor de neutrófilos (NIF), oncostatina M, proteína osteogénica, producto de oncogenes, paracitonina, hormona paratiroidea, PD-ECSF, PDGF, hormona peptídica, pleiotropina, proteína A, proteína G, pth, exotoxina A pirogénica, exotoxina B pirogénica, exotoxina C pirogénica, ppy, relaxina, renina, SCF, proteína biosintética pequeña, receptor I soluble del complemento, I-CAM 1 soluble, receptor soluble de interleucina, receptor soluble de TNF, somatomedina, somatostatina, somatotropina, estreptoquinasa, superantígenos, enterotoxina de estafilococos, enterotoxina, FLT, SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, receptor de hormonas esteroides, superóxido dismutasa, toxina del síndrome del shock tóxico, timosina alfa 1, activador del plasminógeno tisular, factor de crecimiento tumoral (TGF), factor de necrosis tumoral, factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de necrosis tumoral, receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), proteína VLA-4, proteína VCAM-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), uroquinasa, mos, ras, raf, met, p53, tat, fos, myc, jun, myb, rel, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, receptor de testosterona, receptor de aldosterona, receptor de LDL y corticosterona. El polipéptido de aminoácidos no naturales puede también ser homólogo a cualquier polipéptido miembro de la familia de supergenes de la hormona de crecimiento.

Dichas modificaciones incluyen la incorporación de otra funcionalidad en el componente de aminoácido no natural del polipéptido, incluida una funcionalidad deseada.

Por tanto, a modo de ejemplo un polipéptido de aminoácido no natural que contiene uno cualquiera de los aminoácidos siguientes puede modificarse adicionalmente en presencia de los aceleradores descritos en el presente documento usando los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento:

(a)

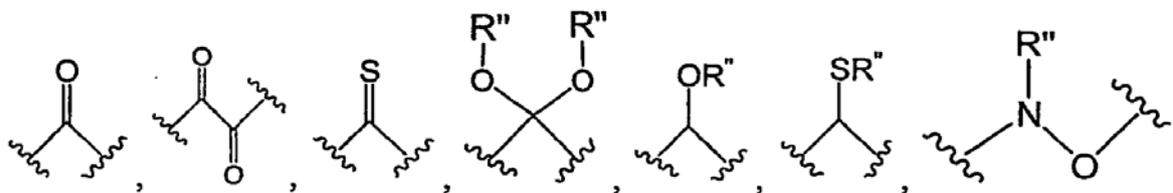


en la que:

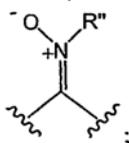
A es opcional y, cuando está presente, es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido.

B es opcional y, cuando está presente, es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido), -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido), -C(S)-, C(S)-(alquileno o alquileno sustituido), -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R') CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R') S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, en las que cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido;

J es



o



5

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; cada R'' es, de forma independiente, H, alquilo, alquilo sustituido o un grupo protector, o cuando hay más de un grupo R'', dos R'' forman, opcionalmente, un heterocicloalquilo;

R<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina; y

10 R<sub>2</sub> es opcional y, cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina;

cada uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es, de forma independiente, H, halógeno, alquilo inferior,

o alquilo inferior sustituido, o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>

o dos grupos R<sub>3</sub> forman, opcionalmente, un cicloalquilo

o un heterocicloalquilo; o los grupos A-B-J-R juntos forman un cicloalquilo bicíclico o tricíclico

15 o heterocicloalquilo que comprende al menos un grupo carbonilo, incluidos un grupo dicarbonilo, grupo carbonilo protegido, incluido un grupo dicarbonilo protegido,

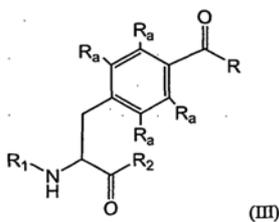
o un grupo carbonilo enmascarado, incluir un grupo dicarbonilo enmascarado;

o el grupo -J-R juntos forma un cicloalquilo o heterocicloalquilo monocíclico o bicíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, incluidos un grupo dicarbonilo, grupo carbonilo protegido, incluido un grupo dicarbonilo protegido,

20 o un grupo carbonilo enmascarado, incluir un grupo dicarbonilo enmascarado;

(b)

25



en la que:

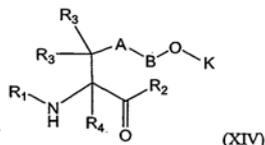
R es alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina; y

30 R<sub>2</sub> es opcional y, cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina; y

cada R<sub>a</sub> se selecciona, de forma independiente, del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' en los que k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' y -S(O)<sub>k</sub>R', en los que cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido.

(c)



5

en la que:

10 A es opcional y, cuando está presente, es alquilenio inferior, alquilenio inferior sustituido, cicloalquilenio inferior, cicloalquilenio inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquilenio inferior, heteroalquilenio sustituido, heterocicloalquilenio inferior, heterocicloalquilenio inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquilenio o aralquilenio sustituido.

15 B es opcional y, cuando está presente, es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquilenio inferior, alquilenio inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquilenio inferior, heteroalquilenio inferior sustituido, -O-, -O-(alquilenio o alquilenio sustituido), -C(O)-, -C(O)-(alquilenio o alquilenio sustituido), -C(S)-, C(S)-(alquilenio o alquilenio sustituido), -N(R')-, -NR'-(alquilenio o alquilenio sustituido), -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquilenio o alquilenio sustituido), -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquilenio o alquilenio sustituido), -N(R') CO-(alquilenio o alquilenio sustituido), -N(R')C(O)O-, -S(O)kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R') S(O)kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, en las que cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido;

20 K es -NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub> o -N=CR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina; y

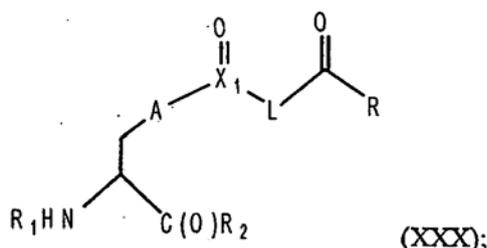
R<sub>2</sub> es opcional y, cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina;

25 cada uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es, de forma independiente, H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> o dos grupos R<sub>3</sub> forman, opcionalmente, un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

30 Cada uno de R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se selecciona, de forma independiente, del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialquilenio, óxido de polialquilenio sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido, -C(O)R'', -C(O)<sub>2</sub>R'', -C(O)N(R'')<sub>2</sub>, donde cada R'' es, de forma independiente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo,

35 o aralquilo sustituido, o R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> es L-X, en la que X es se selecciona del grupo que consiste en una funcionalidad deseada y L es opcional y, cuando está presente, es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquilenio, alquilenio sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquilenio o alquilenio sustituido), -S-, -S-(alquilenio o alquilenio sustituido), -S(O)<sub>k</sub>-, en la que k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquilenio o alquilenio sustituido), -C(O)-, -C(O)-(alquilenio o alquilenio sustituido), -C(S)-, -C(S)-(alquilenio o alquilenio sustituido), -N(R')-, -NR'-(alquilenio o alquilenio sustituido), -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquilenio o alquilenio sustituido), -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquilenio o alquilenio sustituido), -N(R')CO-(alquilenio o alquilenio sustituido), -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>-N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=NN=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, en las que cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido;

40 (d)



en la que;

A es opcional y, cuando está presente, es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido.

5

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

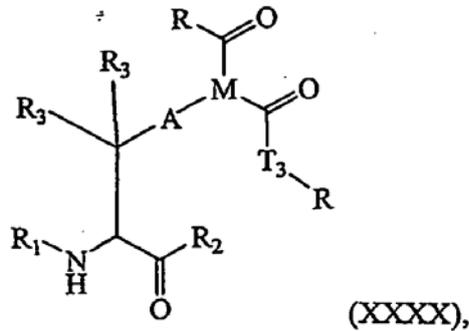
R<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

10

R<sub>2</sub> es opcional y, cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

X<sub>1</sub> es C, S, o S(O); y L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), en los que cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido; o

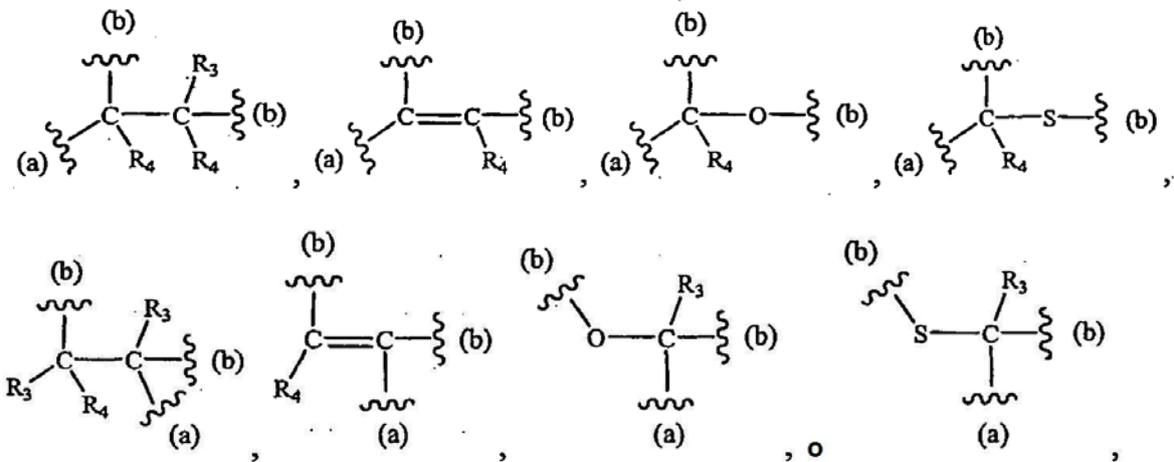
(e)



15 en la que:

A es opcional y, cuando está presente, es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

20 M es -C(R<sub>3</sub>)-,



En las que (a) indica la unión al grupo A y (b) indica la unión a los respectivos grupos carbonilo, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se escogen, de forma independiente, de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> o dos grupos R<sub>3</sub> o dos grupos R<sub>4</sub> forman, opcionalmente, un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

25

R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

T<sub>3</sub> es un enlace, C(R)(R), O, o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

5 R<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y, cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

10 En un aspecto de los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento son composiciones que incluyen al menos una proteína con al menos uno, incluidos, entre otros, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez o más aminoácidos no naturales que se han modificado postraduccionalmente. Los aminoácidos no naturales modificados postraduccionalmente pueden ser iguales o diferentes, incluidos, entre otros, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más sitios diferentes en la proteína que comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos no naturales diferentes modificados postraduccionalmente. En otro aspecto, una composición incluye una proteína con al menos uno, pero menos que todos, de un aminoácido concreto presente en la proteína está sustituido con el aminoácido no natural modificado postraduccionalmente. Para una proteína dada con más de un aminoácido no natural modificado postraduccionalmente, los aminoácidos no naturales modificados postraduccionalmente pueden ser idénticos o diferentes (que incluye, aunque no se limita a ello, la proteína puede incluir dos o más tipos diferentes de aminoácidos no naturales modificados postraduccionalmente o puede incluir dos de los mismos aminoácidos no naturales modificados postraduccionalmente). Para una proteína dada con más de dos aminoácidos no naturales modificados postraduccionalmente, los aminoácidos no naturales modificados postraduccionalmente pueden ser iguales, diferentes o una combinación de un múltiple aminoácido no natural modificado postraduccionalmente del mismo tipo con al menos aminoácido no natural diferente modificado postraduccionalmente.

25 ***A. Procedimientos para modificar postraduccionalmente los polipéptidos de aminoácidos no naturales en presencia de al menos un acelerador: Reacciones de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo con reactivos que contienen hidroxilamina***

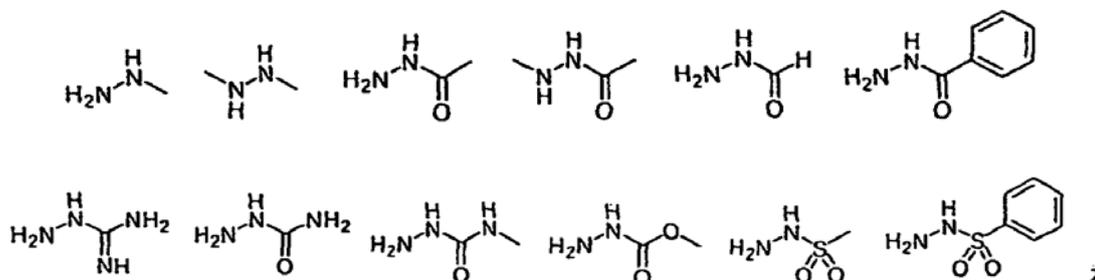
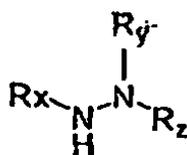
30 Las cadenas laterales de los aminoácidos naturales carecen de sitios altamente electrófilos. Por tanto, la incorporación de un aminoácido no natural con una cadena lateral que contiene electrófilo, incluido, solo a modo de ejemplo, un aminoácido que contiene un grupo carbonilo o dicarbonilo tal como cetona, posibilita la obtención mediante derivación específica de sitio de esta cadena lateral a través de ataque nucleofílico del grupo carbonilo o dicarbonilo. En el caso en el que el nucleófilo atacante sea una hidroxilamina, se generará una proteína derivada de oxima. Los procedimientos para obtener mediante derivación y/o modificación adicional se pueden realizar con un polipéptido que se ha purificado antes de la etapa de derivación o después de la etapa de derivación. Además, la etapa de derivación se puede producir en condiciones levemente ácidas o ligeramente básicas, incluidas, a modo de ejemplo, entre un pH de aproximadamente 2-8 o entre un pH de aproximadamente 4-8.

40 La formación de un aminoácido no natural que contiene oxima o un polipéptido de un aminoácido no natural a partir de la reacción de un aminoácido no natural que contiene carbonilo o un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene carbonilo y un reactivo que contiene hidroxilamina se puede potenciar mediante la adición de un acelerador a la mezcla de reacción. Un acelerador es un compuesto que tiene al menos una de las propiedades siguientes: (a) incrementa la velocidad de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que el incremento de la velocidad es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (b) disminuye la energía de activación de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la energía de activación es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (c) incrementa el rendimiento de un compuesto que contiene oxima de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina, en el que el incremento del rendimiento es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (d) disminuye la temperatura a la cual un compuesto que contiene carbonilo reacciona con compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la temperatura es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (e) disminuye el tiempo necesario para reaccionar un compuesto que contiene carbonilo reacciona con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución del tiempo es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (f) disminuye la cantidad de reactivos necesaria para formar un compuesto oxima en un polipéptido de aminoácidos no naturales, en el que la disminución de la cantidad de reactivos es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (g) disminuye los productos secundarios resultantes de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de los productos secundarios es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (h) no destruye de forma irreversible la estructura

terciaria de un polipéptido sometido a una reacción de formación de oxima en presencia de un acelerador (a excepción de, por supuesto, cuando el fin de la reacción es destruir dicha estructura terciaria); (i) se puede separar de un compuesto que contiene oxima *al vacío*; y (j) modula la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina. En otras formas de realización, el acelerador tiene al menos dos de las propiedades mencionadas con anterioridad, tres de las propiedades mencionadas con anterioridad, cuatro de las propiedades mencionadas con anterioridad, cinco de las propiedades mencionadas con anterioridad, seis de las propiedades mencionadas con anterioridad, siete de las propiedades mencionadas con anterioridad, ocho de las propiedades mencionadas con anterioridad, nueve de las propiedades mencionadas con anterioridad o todas las propiedades mencionadas con anterioridad. En una forma de realización adicional, el acelerador no tiene ninguna de las propiedades mencionadas con anterioridad.

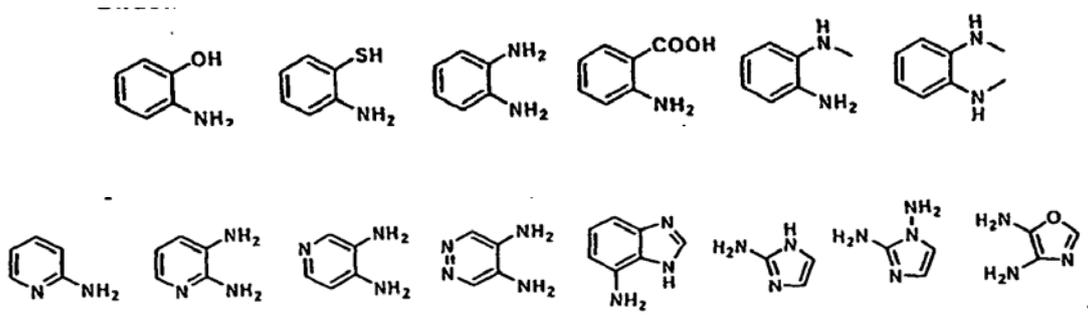
El uso de un acelerador incluye el uso de un único acelerador o múltiples aceleradores. Además, la proporción molar entre el acelerador y el compuesto que contiene carbonilo incluye valores entre aproximadamente 0,5:1 a 5000:1, incluidos, únicamente a modo de ejemplo, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, y 0,5:1. Además, la proporción molar entre el acelerador y el compuesto que contiene hidroxilamina incluye valores entre aproximadamente 0,5:1 a 5000:1, incluidos, solo a modo de ejemplo, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, y 0,5:1. Además, el acelerador incluye compuestos que sustancialmente se pueden eliminar *al vacío* del compuesto que contiene oxima resultante. Además, el acelerador incluye compuestos que contienen un resto de diamina, un resto de semicarbazida, una hidrazina o un resto de hidrazida.

Además, en cualquiera de los aspectos o formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador se selecciona del grupo que consiste en aminas aromáticas bifuncionales, derivados de oxoamina y compuestos que tienen las estructuras siguientes:



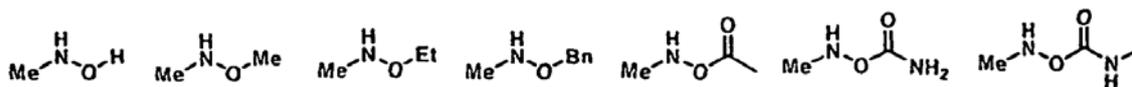
en las que  $R_x$ ,  $R_y$  y  $R_z$  se seleccionan del grupo que consiste en:  $L_x$ -H,  $L_x$ -alquilo,  $L_x$ -arilo,  $L_x$ -heteroarilo,  $L_x$ -alquenilo,  $L_x$ -alquinilo,  $L_x$ -alcoxi y  $L_x$ -alquilamina, en los que  $L_x$  es un enlace, C(=O), C(=NH) y C(=NH)-NH y SO, SO<sub>2</sub>, en los que la amina aromática se selecciona del grupo:

**Aminas aromáticas bifuncionales:**

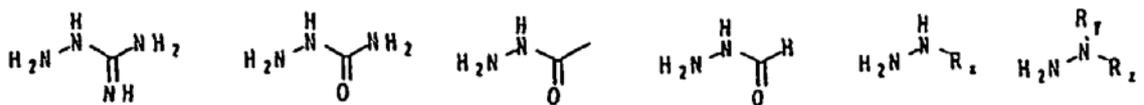


y en la forma de realización adicional, el derivado de oxoamina se selecciona del grupo:

**Derivados de oxoamina:**



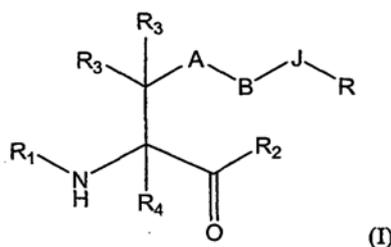
Además, el acelerador incluye compuestos seleccionados del grupo que consiste en:



- 5 en las que R<sub>x</sub>, R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> se seleccionan del grupo que consiste en: L<sub>x</sub>-H, L<sub>x</sub>-alquilo, L<sub>x</sub>-arilo, L<sub>x</sub>-heteroarilo, L<sub>x</sub>-alqueni-  
 10 alquini-  
 15 lo, L<sub>x</sub>-alcoxi y L<sub>x</sub>-alquilamina, en los que L<sub>x</sub> es un enlace, C(=O), C(=NH) y C(=NH)-NH. Además, en cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador se selecciona de los compuestos presentados en las FIG. 5, FIG. 9 o FIG. 10, incluidos, a modo de ejemplo, cualquiera de los compuestos 6, 8, 10, 7 y 20 de la Figura 5. En cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador incluye un agente que puede formar una hidrazona tras la reacción con un grupo que contiene carbonilo. Además, en cualquiera de los aspectos mencionados con anterioridad, la actividad del acelerador depende de la velocidad de la reacción con el resto de cetona y la estabilidad del intermedio resultante. Además, en cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el pH de la mezcla de reacción que comprende el acelerador, el compuesto que contiene carbonilo y el compuesto que contiene hidroxilamina está entre aproximadamente 2,0 y 10; entre aproximadamente 2,0 y 9,0; entre aproximadamente 2,0 y 8,0; entre aproximadamente 3,0 y 7,0; entre aproximadamente 4,0 y 6,0; entre 3,0 y 10,0; entre aproximadamente 4,0 y 10,0; entre aproximadamente 3,0 y 9,0; entre aproximadamente 3,0 y 8,0; entre aproximadamente 2,0 y 7,0; entre aproximadamente 3,0 y 6,0; entre aproximadamente 4,0 y 9,0; entre aproximadamente 4,0 y 8,0; entre aproximadamente 4,0 y 7,0; entre aproximadamente 4,0 y 6,5; entre aproximadamente 4,5 y 6,5; aproximadamente 4,0; aproximadamente 4,5; aproximadamente 5,0; aproximadamente 5,5; aproximadamente 6,0; aproximadamente 6,5; y aproximadamente 7,0.

Un procedimiento de obtención de proteína mediante derivación basado en la reacción de una proteína que contiene carbonilo o dicarbonilo con una molécula sustituida con hidroxilamina tiene distintas ventajas. En primer lugar, las hidroxilaminas sufren condensación con compuestos que contienen carbonilo o dicarbonilo en un pH entre aproximadamente 2 y 8 (y, en otras formas de realización, en un pH entre aproximadamente 4 y 8) para generar aductos de oxima. En estas condiciones, las cadenas laterales de los aminoácidos naturales no son reactivas. En segundo lugar, dicha química selectiva hace posible la obtención mediante derivación específica de sitio de proteínas recombinantes: las proteínas derivadas pueden prepararse ahora como productos homogéneos definidos. En tercer lugar, las condiciones leves necesarias para efectuar la reacción de las hidroxilaminas descritas en el presente documento con los polipéptidos que contienen carbonilo o dicarbonilo descritos en el presente documento, en general, no destruyen de forma irreversible la estructura terciaria del polipéptido (a excepción de, por supuesto, cuando el propósito de la reacción es destruir dicha estructura terciaria). Por último, aunque el amino con el grupo hidroxilamina parece estar metabolizado por *E. coli*, la condensación de las hidroxilaminas con moléculas que contienen carbonilo o dicarbonilo genera aductos de oxima que son estables en condiciones biológicas.

A modo de ejemplo, los siguientes aminoácidos no naturales son el tipo de aminoácidos que contienen carbonilo o dicarbonilo que son reactivos con los reactivos que contienen hidroxilamina descritos en el presente documento para formar un aminoácido no natural que contiene oxima o un polipéptido en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento):



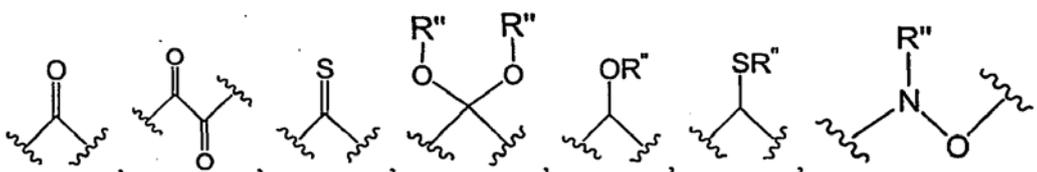
40 en la que:

A es opcional y, cuando está presente, es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alqueni-  
 lo inferior, alqueni-  
 lo inferior sustituido, alquini-  
 lo inferior, heteroalquileo

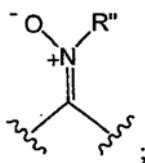
inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido.

5 B es opcional y, cuando está presente, es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido), -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido), -C(S)-, C(S)-(alquileno o alquileno sustituido), -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido), -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R') CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R') S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, en las que cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido;

J es



15 o



R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

cada R'' es, de forma independiente, H, alquilo, alquilo sustituido, o un grupo protector, o cuando hay más de un grupo R'', dos R'' forman, opcionalmente, un heterocicloalquilo;

20 R<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina; y

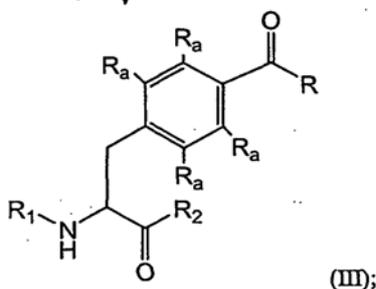
R<sub>2</sub> es opcional y, cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina;

cada uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es, de forma independiente, H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> o dos grupos R<sub>3</sub> forman, opcionalmente, un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

25 o los grupos A-B-J-R juntos forman un cicloalquilo o heterocicloalquilo bicíclico o tricíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, incluidos un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, incluido un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, incluido un grupo dicarbonilo enmascarado;

o el grupo -J-R juntos forma un cicloalquilo o heterocicloalquilo monocíclico o bicíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, incluidos un grupo dicarbonilo, grupo carbonilo protegido, incluido un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, incluido un grupo dicarbonilo enmascarado.

30 A modo de ejemplo para los fines mencionados con anterioridad, los compuestos de Fórmula (I) incluyen compuestos que tienen la estructura:



en la que:

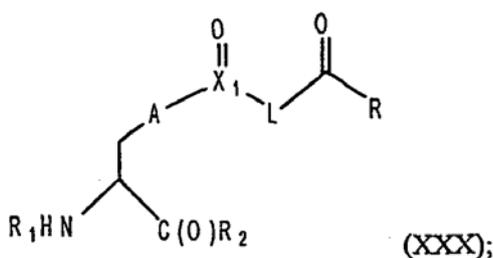
R es alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina; y

5 R<sub>2</sub> es opcional y, cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina; y

cada R<sub>a</sub> se selecciona, de forma independiente, del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' en los que k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' y -S(O)<sub>k</sub>R', en los que cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido.

10 A modo de ejemplo para los fines mencionados con anterioridad, los compuestos de Fórmula (I) incluyen compuestos que tienen la estructura:



en la que;

15 A es opcional y, cuando está presente, es alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, cicloalquilenos inferior, cicloalquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior, heteroalquilenos inferior, heteroalquilenos inferior sustituido, heterocicloalquilenos inferior, heterocicloalquilenos inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquilenos inferior o aralquilenos inferior sustituido.

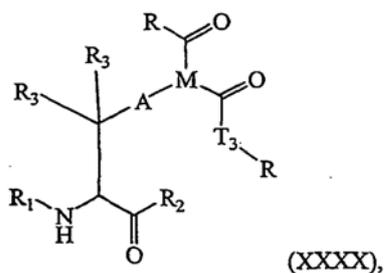
R es alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

20 R<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

R<sub>2</sub> es opcional y, cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

X<sub>1</sub> es C, S, o S(O); y L es un enlace, alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, N(R')(alquilenos inferior) o N(R')(alquilenos inferior sustituido), en los que cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido.

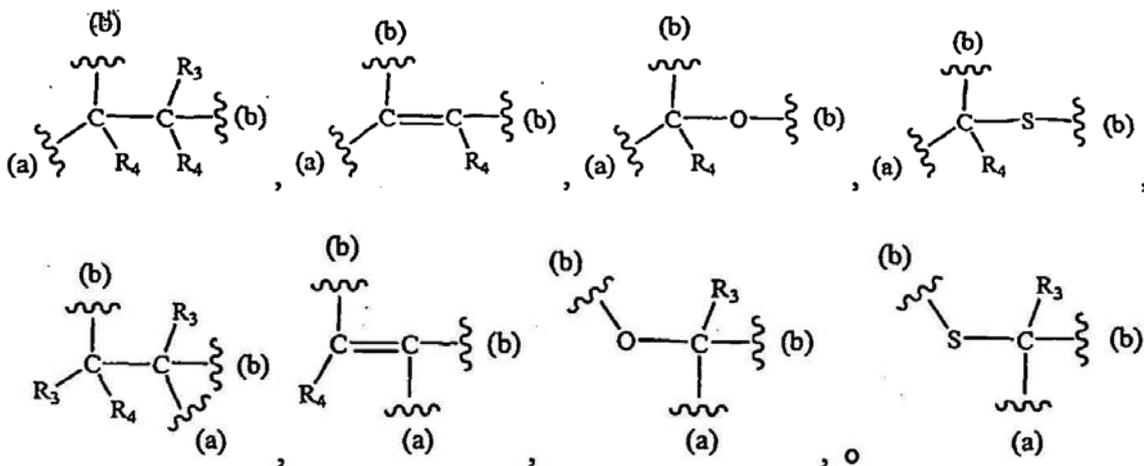
25 A modo de ejemplo para los fines mencionados con anterioridad, los compuestos de Fórmula (I) incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (XXXX):



en la que:

5 A es opcional y, cuando está presente, es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileo inferior, alquenileo inferior sustituido, alquinileo, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido.

M es -C(R<sub>3</sub>)-,



10 En las que (a) indica la unión al grupo A y (b) indica la unión a los respectivos grupos carbonilo, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se escogen, de forma independiente, de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> o dos grupos R<sub>3</sub> o dos grupos R<sub>4</sub> forman, opcionalmente, un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

R es alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

15 T<sub>3</sub> es un enlace, C(R)(R), O, o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

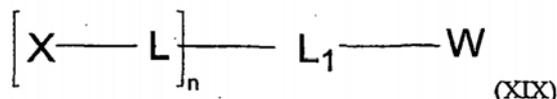
y

20 R<sub>2</sub> es opcional y, cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

Los tipos de polipéptidos que comprenden dichos aminoácidos no naturales que contienen carbonilo o dicarbonilo son prácticamente ilimitados siempre que el aminoácido no natural que contiene carbonilo o dicarbonilo se localice en el polipéptido, de modo que el reactivo de hidroxilamina pueda reaccionar con el grupo carbonilo o dicarbonilo y no cree un aminoácido no natural modificado resultante que destruya la estructura terciaria del polipéptido (excepto si, por supuesto, dicha reacción es el fin de la reacción).

A modo de ejemplo, los siguientes reactivos que contienen hidroxilamina son el tipo de reactivos que contienen hidroxilamina que son reactivos con los aminoácidos no naturales que contienen carbonilo o dicarbonilo descritos en el presente documento para formar un aminoácido no natural que contiene oxima en presencia de un acelerador descrito

en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento):



en la que:

- 5 cada X es, de forma independiente, H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, -(alquileo o alquileo sustituido)-ON(R'')<sub>2</sub>, -(alquileo o alquileo sustituido)-C(O)<sub>s</sub>R'', -(alquileo o alquileo sustituido)-SS-(arilo o arilo sustituido), -C(O)R'', -C(O)<sub>2</sub>R'', o -C(O)N(R'')<sub>2</sub>, donde  
10 cada R'' es, de forma independiente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido;

o cada X se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en una funcionalidad deseada;

- 15 cada L se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido), -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- en el que k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -(alquileo o alquileo sustituido)NR'C(O)O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -O-CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(O)O-(alquileo o alquileo sustituido), -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N-, y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-;

L<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente es -C(R')<sub>p</sub>-NR'-C(O)O-(alquileo o alquileo sustituido), en la que p es 0, 1 o 2, cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido;

- 25 W es N(R<sub>8</sub>)<sub>2</sub>, en la que cada R<sub>8</sub> es, de forma independiente, H o un grupo protector de amino; y n es de 1 a 3; siempre que L-L<sub>1</sub>-W juntos proporcionen al menos un grupo de hidroxilamina capaz de reaccionar con un grupo carbonilo (incluido un dicarbonilo) en un aminoácido no natural o un polipéptido de aminoácido no natural (modificado).

- 30 En una forma de realización ilustrativa, a una solución tamponada (pH 2-8) de un polipéptido de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo y un acelerador se añade un reactivo obtenido mediante derivación de hidroxilamina. El polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene oxima resultante se purifica mediante HPLC, FPLC o cromatografía de exclusión por tamaño.

- 35 En otra forma de realización o una forma de realización ilustrativa alternativa, la proporción molar de un compuesto de Fórmula (I) y un compuesto de Fórmula (XIX) es de aproximadamente 1:2; 1:1; 1,5:1; 1,5:2; 2:1; 1:1,5; 2:1,5; o de 1,5 a 2.

- 40 En una forma de realización, múltiples químicas de enlazadores pueden reaccionar de forma específica de sitio con un polipéptido de aminoácidos no naturales sustituido con carbonilo o dicarbonilo para formar un enlace oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En una forma de realización, los procedimientos de enlazador descritos en el presente documento usan enlazadores que contienen la funcionalidad hidroxilamina en al menos un extremo del enlazador (mono, bi o multifuncional). La condensación de un enlazador derivado de hidroxilamina con una proteína sustituida con ceto genera un enlace oxima estable. Enlazadores bi y/o multifuncionales (p. ej., hidroxilamina con una o más químicas de enlace distintas) permiten la conexión específica de sitio de diferentes moléculas (p. ej., otras proteínas, polímeros o moléculas pequeñas) con el polipéptido de aminoácidos no naturales, mientras que los enlazadores monofuncionales (sustituidos con hidroxilamina en todos los extremos) facilitan la dimerización u oligomerización específica de sitio del polipéptido de aminoácidos no naturales. Combinando esta estrategia de enlace con la tecnología de traducción *in vivo* descrita en el presente documento, se hace posible especificar las estructuras tridimensionales de las proteínas elaboradas químicamente.

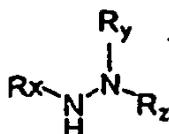
- 50 *B. Procedimientos para modificar postraduccionalmente los polipéptidos de aminoácidos no naturales en presencia de al menos un acelerador: Reacciones de aminoácidos no naturales que contienen hidroxilamina con reactivos que contienen carbonilo*

Las técnicas y composiciones de modificación postraduccionales descritas anteriormente también se pueden usar con aminoácidos no naturales que contienen hidroxilamina que reaccionan con los reactivos que contienen carbonilo o dicarbonilo para producir polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento).

La formación de un aminoácido no natural que contiene oxima o un polipéptido de un aminoácido no natural a partir de la reacción de un aminoácido no natural que contiene hidroxilamina o un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene hidroxilamina y un reactivo que contiene carbonilo se puede potenciar mediante la adición de un acelerador a la mezcla de reacción. Un acelerador es un compuesto que tiene al menos una de las propiedades siguientes: (a) incrementa la velocidad de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que el incremento de la velocidad es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (b) disminuye la energía de activación de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la energía de activación es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (c) incrementa el rendimiento de un compuesto que contiene oxima de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina, en el que el incremento del rendimiento es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (d) disminuye la temperatura a la cual un compuesto que contiene carbonilo reacciona con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la temperatura es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (e) disminuye el tiempo necesario para reaccionar un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución del tiempo es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (f) disminuye la cantidad de reactivos necesaria para formar un compuesto oxima en un polipéptido de aminoácidos no naturales, en el que la disminución de la cantidad de reactivos es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (g) disminuye los productos secundarios resultantes de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de los productos secundarios es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (h) no destruye de forma irreversible la estructura terciaria de un polipéptido sometido a una reacción de formación de oxima en presencia de un acelerador (a excepción de, por supuesto, cuando el fin de la reacción es destruir dicha estructura terciaria); (i) se puede separar de un compuesto que contiene oxima *al vacío*; y (j) modula la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina. En otras formas de realización, el acelerador tiene al menos dos de las propiedades mencionadas con anterioridad, tres de las propiedades mencionadas con anterioridad, cuatro de las propiedades mencionadas con anterioridad, cinco de las propiedades mencionadas con anterioridad, seis de las propiedades mencionadas con anterioridad, siete de las propiedades mencionadas con anterioridad, ocho de las propiedades mencionadas con anterioridad, nueve de las propiedades mencionadas con anterioridad o todas las propiedades mencionadas con anterioridad. En una forma de realización adicional, el acelerador no tiene ninguna de las propiedades mencionadas con anterioridad.

El uso de un acelerador incluye el uso de un único acelerador o múltiples aceleradores. Además, la proporción molar entre el acelerador y el compuesto que contiene carbonilo incluye valores entre aproximadamente 0,5:1 a 5000:1, incluidos, únicamente a modo de ejemplo, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, y 0,5:1. Además, la proporción molar entre el acelerador y el compuesto que contiene hidroxilamina incluye valores entre aproximadamente 0,5:1 a 5000:1, incluidos, solo a modo de ejemplo, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, y 0,5:1. Además, el acelerador incluye compuestos que sustancialmente se pueden eliminar *al vacío* del compuesto que contiene oxima resultante. Además, el acelerador incluye compuestos que contienen un resto de diamina, un resto de semicarbazida, una hidrazina o un resto de hidrazida.

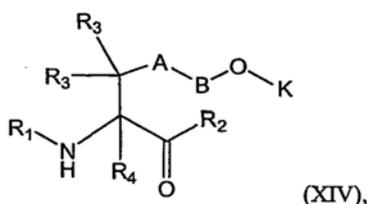
Además, en cualquiera de los aspectos o formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador se selecciona del grupo que consiste en aminas aromáticas bifuncionales, derivados de oxoamina y compuestos que tienen las estructuras siguientes:





Un procedimiento de obtención de proteína mediante derivación basado en la reacción de una proteína que contiene hidroxilamina con una molécula sustituida con carbonilo o dicarbonilo tiene distintas ventajas. En primer lugar, las hidroxilaminas sufren condensación con compuestos que contienen carbonilo o dicarbonilo en un pH entre aproximadamente 2 y 8 (y, en otras formas de realización, en un pH entre aproximadamente 4 y 8) para generar aductos de oxima. En estas condiciones, las cadenas laterales de los aminoácidos naturales no son reactivas. En segundo lugar, dicha química selectiva hace posible la obtención mediante derivación específica de sitio de proteínas recombinantes: las proteínas derivadas pueden prepararse ahora como productos homogéneos definidos. En tercer lugar, las condiciones leves necesarias para efectuar la reacción de los reactivos que contienen carbonilo o dicarbonilo descritos en el presente documento con los polipéptidos que contienen hidroxilamina descritos en el presente documento, en general, no destruyen de forma irreversible la estructura terciaria del polipéptido (a excepción de, por supuesto, cuando el propósito de la reacción es destruir dicha estructura terciaria). Por último, aunque el amino con el grupo hidroxilamina parece estar metabolizado por *E. coli*, la condensación de los reactivos que contienen carbonilo o dicarbonilo con aminoácidos que contienen hidroxilamina genera aductos de oxima que son estables en condiciones biológicas.

A modo de ejemplo, los siguientes aminoácidos no naturales son el tipo de aminoácidos que contienen hidroxilamina que son reactivos con los reactivos que contienen carbonilo o dicarbonilo descritos en el presente documento para formar un aminoácido no natural que contiene oxima o un polipéptido en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento):



en la que:

A es opcional y, cuando está presente, es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido.

B es opcional y, cuando está presente, es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido), -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido), -C(S)-, C(S)-(alquileo o alquileo sustituido), -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R') CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R') S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, en las que cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido;

K es NH<sub>2</sub>;

R<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

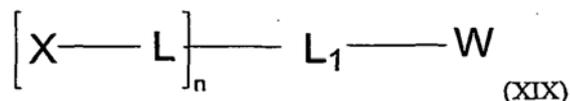
y

R<sub>2</sub> es opcional y, cuando está presente, es OH, un éster, un grupo protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es, de forma independiente, H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> o dos grupos R<sub>3</sub> forman, opcionalmente, un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

Los tipos de polipéptidos que comprenden dichos aminoácidos no naturales que contienen hidroxilamina son prácticamente ilimitados siempre que el aminoácido no natural que contiene hidroxilamina se localice en el polipéptido, de modo que el reactivo que contiene carbonilo o dicarbonilo pueda reaccionar con el grupo hidroxilamina y no cree un aminoácido no natural modificado resultante que destruya la estructura terciaria del polipéptido (excepto si, por supuesto, dicha reacción es el fin de la reacción).

A modo de ejemplo, los siguientes reactivos que contienen carbonilo o dicarbonilo son el tipo de reactivos que contienen carbonilo o dicarbonilo que son reactivos con los aminoácidos no naturales que contienen hidroxilamina

descritos en el presente documento para formar un aminoácido no natural que contiene oxima o polipéptido en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento):



5 en la que:

10 cada X es, de forma independiente, H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquínilo, alquínilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, -(alquileo o alquileo sustituido)-ON(R'')<sub>2</sub>, -(alquileo o alquileo sustituido)-C(O)<sub>s</sub>R'', -(alquileo o alquileo sustituido)-SS-(arilo o arilo sustituido), -C(O)R'', -C(O)<sub>2</sub>R'', o -C(O)N(R'')<sub>2</sub>, donde cada R'' es, de forma independiente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido;

o cada X se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en una funcionalidad deseada;

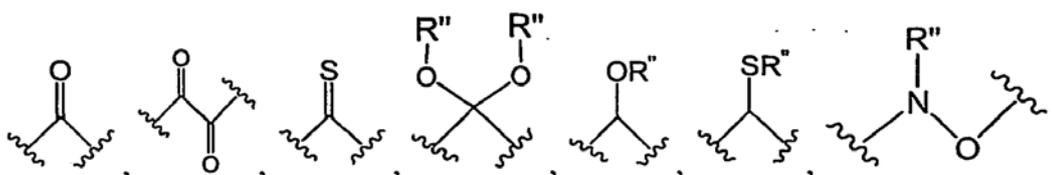
15 cada L se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido), -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- en el que k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -(alquileo o alquileo sustituido)NR'C(O)O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -O-CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(O)O-(alquileo o alquileo sustituido), -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N-, y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-;

20 L<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente es -C(R')<sub>p</sub>-NR'-C(O)O-(alquileo o alquileo sustituido), en la que p es 0, 1 o 2;

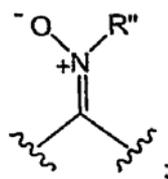
cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido;

W es -J-R, cuando

J es



30 o



R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; cada R'' es, de forma independiente, H, alquilo, alquilo sustituido o un grupo protector, o cuando hay más de un grupo R'', dos R'' forman, opcionalmente, un heterocicloalquilo;

35 y n es de 1 a 3;

a condición de que L-L<sub>1</sub>-W juntos proporcionen al menos un grupo carbonilo (incluido un grupo dicarbonilo) capaz de reaccionar con un grupo hidroxilamina en un aminoácido no natural o un polipéptido de aminoácido no

natural (modificado).

En una forma de realización ilustrativa, a una solución tamponada (pH 2-8) de un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene hidroxilamina un acelerador se añade un reactivo obtenido mediante derivación de carbonilo. El polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene oxima resultante se purifica mediante HPLC, FPLC o cromatografía de exclusión por tamaño.

En otra forma de realización o una forma de realización ilustrativa alternativa, la proporción molar de un compuesto de Fórmula (XIV) y un compuesto de Fórmula (XIX) es de aproximadamente 1:2; 1:1; 1,5:1; 1,5:2; 2:1; 1:1,5; 2:1,5; o de 1,5 a 2.

En una forma de realización, múltiples químicas de enlace pueden reaccionar de forma específica de sitio con un polipéptido de aminoácidos no naturales sustituidos con hidroxilamina. En una forma de realización, los procedimientos de enlazador descritos en el presente documento usan enlazadores que contienen la funcionalidad carbonilo o dicarbonilo en al menos un extremo del enlazador (mono, bi o multifuncional). La condensación de un enlazador derivado de carbonilo o dicarbonilo con una proteína sustituida con ceto genera un enlace oxima estable. Enlazadores bi y/o multifuncionales (p. ej., carbonilo o dicarbonilo con una o más químicas de enlace distintas) permiten la conexión específica de sitio de diferentes moléculas (p. ej., otras proteínas, polímeros o moléculas pequeñas) con el polipéptido de aminoácidos no naturales, mientras que los enlazadores monofuncionales (sustituidos con carbonilo o dicarbonilo en todos los extremos) facilitan la dimerización u oligomerización específica de sitio del polipéptido de aminoácidos no naturales. Combinando esta estrategia de enlace con la tecnología de traducción *in vivo* descrita en el presente documento, se hace posible especificar las estructuras tridimensionales de las proteínas elaboradas químicamente.

*C. Ejemplo de la adición de una funcionalidad en presencia de al menos un acelerador: Polímeros macromoleculares acoplados a polipéptidos de aminoácidos no naturales*

Se pueden efectuar varias modificaciones en los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento usando las composiciones, procedimientos, técnicas y estrategias descritas en el presente documento. Estas modificaciones incluyen la incorporación de una funcionalidad adicional en el componente de aminoácido no natural del polipéptido mediante un enlace oxima formado en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento), incluida, entre otras, una funcionalidad deseada. Como ilustración, ejemplo de las composiciones, procedimientos, técnicas y estrategias descritas en el presente documento, la siguiente descripción se centrará en la adición de polímeros macromoleculares al polipéptido de aminoácidos no naturales con la comprensión de que la composición, procedimientos, técnicas y estrategias descritas también son aplicables (con modificaciones adecuadas, en caso necesario, y las que un experto en la técnica podría efectuar con las divulgaciones del presente documento) a la adición de otras funcionalidades, incluidas las enumeradas con anterioridad.

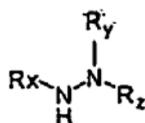
La formación de un polímero macromolecular acoplado a través de un enlace oxima a un polipéptido de un aminoácido no natural a partir de (a) la reacción de un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene hidroxilamina y un reactivo que contiene carbonilo o (b) la reacción de un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene carbonilo y un reactivo que contiene hidroxilamina se puede potenciar mediante la adición de un acelerador a la mezcla de reacción. Dicho acelerador es un compuesto que tiene al menos una de las propiedades siguientes: (a) incrementa la velocidad de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que el incremento de la velocidad es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (b) disminuye la energía de activación de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la energía de activación es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (c) incrementa el rendimiento de un compuesto que contiene oxima de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina, en el que el incremento del rendimiento es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (d) disminuye la temperatura a la cual un compuesto que contiene carbonilo reacciona con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la temperatura es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (e) disminuye el tiempo necesario para reaccionar un compuesto que contiene carbonilo reacciona con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución del tiempo es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (f) disminuye la cantidad de reactivos necesaria para formar un compuesto oxima en un polipéptido de aminoácidos no naturales, en el que la disminución de la cantidad de reactivos es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (g) disminuye los productos secundarios resultantes de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de los productos secundarios es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (h) no destruye de forma irreversible la estructura terciaria de un polipéptido sometido a una reacción de formación de oxima en presencia de un acelerador (a excepción de, por supuesto, cuando el fin de la reacción es destruir dicha estructura terciaria); (i) se puede separar de un compuesto que contiene oxima *al vacío*; y (j) modula la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina. En otras formas de realización, el acelerador tiene al menos dos de las

5 propiedades mencionadas con anterioridad, tres de las propiedades mencionadas con anterioridad, cuatro de las propiedades mencionadas con anterioridad, cinco de las propiedades mencionadas con anterioridad, seis de las propiedades mencionadas con anterioridad, siete de las propiedades mencionadas con anterioridad, ocho de las propiedades mencionadas con anterioridad, nueve de las propiedades mencionadas con anterioridad o todas las propiedades mencionadas con anterioridad. En una forma de realización adicional, el acelerador no tiene ninguna de las propiedades mencionadas con anterioridad.

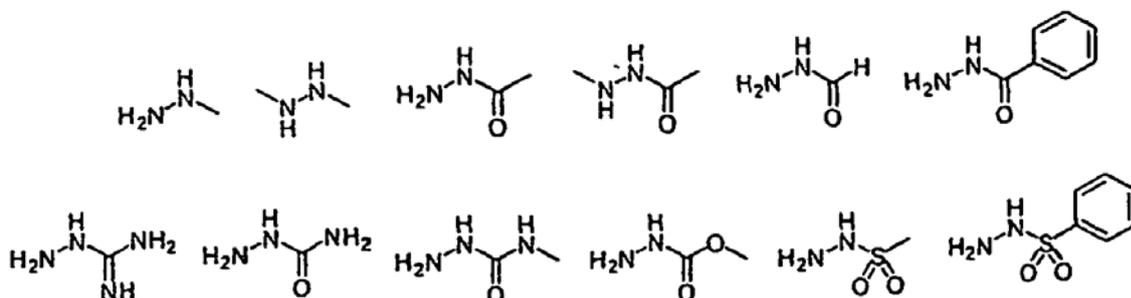
10 El uso de un acelerador incluye el uso de un único acelerador o múltiples aceleradores. Además, la proporción molar entre el acelerador y el compuesto que contiene carbonilo incluye valores entre aproximadamente 0,5:1 a 5000:1, incluidos, únicamente a modo de ejemplo, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, y 0,5:1. Además, la proporción molar entre el acelerador y el compuesto que contiene hidroxilamina incluye valores entre aproximadamente 0,5:1 a 5000:1, incluidos, solo a modo de ejemplo, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, y 0,5:1. Además, el acelerador incluye compuestos que sustancialmente se pueden eliminar *al vacío* del compuesto que contiene oxima resultante.

15 Además, el acelerador incluye compuestos que contienen un resto de diamina, un resto de semicarbazida, una hidrazina o un resto de hidrazida.

Además, en cualquiera de los aspectos o formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador se selecciona del grupo que consiste en aminas aromáticas bifuncionales, derivados de oxoamina y compuestos que tienen las estructuras siguientes:

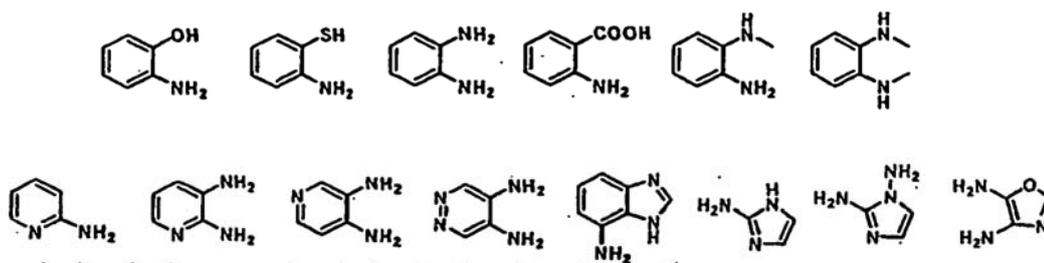


20



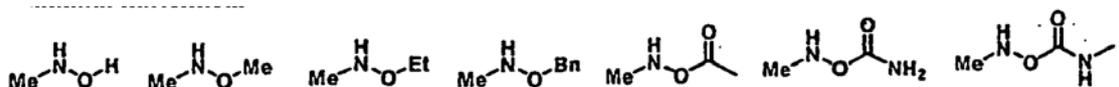
25 en las que  $R_x$ ,  $R_y$  y  $R_z$  se seleccionan del grupo que consiste en:  $L_x$ -H,  $L_x$ -alquilo,  $L_x$ -arilo,  $L_x$ -heteroarilo,  $L_x$ -alqueno,  $L_x$ -alquino,  $L_x$ -alcoxi y  $L_x$ -alquilamina, en los que  $L_x$  es un enlace, C(=O), C(=NH) y C(=NH)-NH y SO, SO<sub>2</sub>, en los que la amina aromática se selecciona del grupo:

**Aminas aromáticas bifuncionales:**

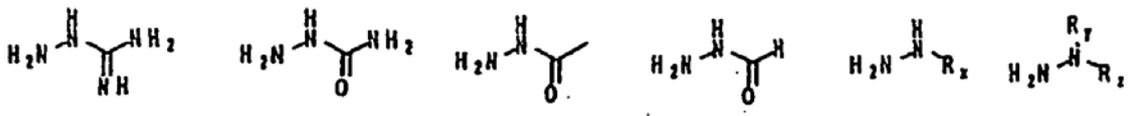


30 y en las que el derivado de oxoamina se selecciona del grupo:

**Derivados de oxoamina:**



Además, el acelerador incluye compuestos seleccionados del grupo que consiste en:



5 en las que  $R_x$ ,  $R_y$  y  $R_z$  se seleccionan del grupo que consiste en:  $L_x$ -H,  $L_x$ -alquilo,  $L_x$ -arilo,  $L_x$ -heteroarilo,  $L_x$ -alquenilo,  $L_x$ -alquinilo,  $L_x$ -alcoxi y  $L_x$ -alquilamina, en los que  $L_x$  es un enlace,  $C(=O)$ ,  $C(=NH)$  y  $C(=NH)-NH$ . Además, en cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador se selecciona de los compuestos presentados en las FIG. 5, FIG. 9 o FIG. 10, incluidos, a modo de ejemplo, cualquiera de los compuestos 6, 8, 10, 7 y 20 de la Figura 5. En cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador incluye un agente que puede formar una hidrazona tras la reacción con un grupo que contiene carbonilo. Además, en cualquiera de los aspectos mencionados con anterioridad, la actividad del acelerador depende de la velocidad de la reacción con el resto de cetona y la estabilidad del intermedio resultante. Además, en cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el pH de la mezcla de reacción que comprende el acelerador, el compuesto que contiene carbonilo y el compuesto que contiene hidroxilamina está entre aproximadamente 2,0 y 10; entre aproximadamente 2,0 y 9,0; entre aproximadamente 2,0 y 8,0; entre aproximadamente 3,0 y 7,0; entre aproximadamente 4,0 y 6,0; entre 3,0 y 10,0; entre aproximadamente 4,0 y 10,0; entre aproximadamente 3,0 y 9,0; entre aproximadamente 3,0 y 8,0; entre aproximadamente 2,0 y 7,0; entre aproximadamente 3,0 y 6,0; entre aproximadamente 4,0 y 9,0; entre aproximadamente 4,0 y 8,0; entre aproximadamente 4,0 y 7,0; entre aproximadamente 4,0 y 6,5; entre aproximadamente 4,5 y 6,5; aproximadamente 4,0; aproximadamente 4,5; aproximadamente 5,0; aproximadamente 5,5; aproximadamente 6,0; aproximadamente 6,5; y aproximadamente 7,0.

20 Una amplia variedad de polímeros macromoleculares y otras moléculas se pueden acoplar a los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento para modular propiedades biológicas del polipéptido de aminoácidos no naturales (o el correspondiente polipéptido de aminoácidos naturales) y/o proporcionar nuevas propiedades biológicas al polipéptido de aminoácidos no naturales (o el correspondiente polipéptido de aminoácidos naturales). Estos polímeros macromoleculares se pueden acoplar al polipéptido de aminoácidos no naturales a través de un enlace oxima en el aminoácido no natural.

30 Polímeros hidrosolubles se pueden acoplar a los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento. El polímeros hidrosoluble puede acoplarse al aminoácido no natural a través de un enlace oxima. En algunos casos, los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento comprenden uno o más aminoácidos no naturales unidos a polímeros hidrosolubles y uno o más aminoácidos naturales unidos a polímeros hidrosolubles. La unión covalente de polímeros hidrófilos a una molécula biológicamente activa representa un enfoque a la mayor solubilidad en agua (tal como en un ambiente fisiológico), biodisponibilidad, incremento de semivida en suero, incremento de la semivida terapéutica, modulación de la inmunogenicidad, modulación de la actividad biológica o extensión del tiempo de circulación de la molécula biológicamente activa, incluidas proteínas, péptidos y moléculas particularmente hidrófobas. Otras características importantes de dichos polímeros hidrófilos incluyen biocompatibilidad, falta de toxicidad y falta de inmunogenicidad. Preferentemente, para el uso terapéutico de la preparación final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

40 Ejemplos de polímeros hidrófilos adecuados incluyen: Polialquiléteres y análogos de los mismos con alcoxi terminales (p. ej., polioxietilenglicol, polioxietilén/propilenglicol, y análogos de los mismos con metoxi o etoxi terminales, especialmente polioxietilenglicol, este último también se conoce como polietilenglicol o PEG); polivinilpirrolidonas; polivinilalquiléteres; polioxazolin, polialquinoxazolin y polihidroxialquinoxazolin; poli(acrilamidas, polialquilacrilamidas, y polihidroxialquilacrilamidas (p.ej., polihidroxipropilmetacrilamida y derivados de las mismas); polihidroxialquilacrilatos; ácidos polisialícos y análogos de los mismos; secuencias peptídicas hidrófilas; polisacáridos y sus derivados, incluidos dextrano y derivados de dextrano, por ejemplo carboximetildextrano, sulfatos de dextrano, aminodextrano; celulosa y sus derivados, por ejemplo carboximetilcelulosa, hidroxialquilcelulosas; quitina y sus derivados, por ejemplo quitosano, succinil quitosano, carboximetilquitina, carboximetilquitosano; ácido hialurónico y sus derivados; almidones; alginatos; condroitínsulfato; albúmina; pululano y carboximetilpululano; poliaminoácidos y derivados de los mismos, por ejemplo ácidos poliglutámicos, polilisinas, ácidos poliaspárticos, poliaspartamidas; copolímeros de anhídrido maleico tales como: Copolímero de anhídrido estireno maleico, copolímero de diviniléter anhídrido maleico; polivinilalcoholes; copolímeros de los mismos, terpolímeros de los mismos; mezclas de los mismos; y derivados de los anteriores. El polímero hidrosoluble puede ser cualquier forma estructural, incluidas, entre otras, bifurcadas o ramificadas. En algunas formas de realización, son particularmente útiles las estructuras poliméricas que

- son hidrosolubles con de 2 a aproximadamente 300 extremos. Derivados poliméricos multifuncionales incluyen, entre otros, polímeros lineales que tienen dos extremos, estando cada extremo unido a un grupo funcional que puede ser igual o diferente. En algunas formas de realización, el polímero hidrosoluble comprende un resto de poli(etilenglicol). El peso molecular del polímero puede ser de una amplia gama, incluidos, entre otros, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, y 100 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado. El peso molecular del PEG de cadena ramificada puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluidos, entre otros, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, y 1.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da. Los expertos en la técnica reconocerán que la lista anterior de estructuras sustancialmente hidrosolubles no es, de ningún modo, exhaustiva y es simplemente ilustrativa, y que todos los materiales poliméricos que tienen las calidades descritas con anterioridad se contemplan como adecuadas para usar en procedimientos y composiciones descritos en el presente documento.
- 30 Como se ha descrito anteriormente, un ejemplo de un polímero hidrófilo es poli(etilenglicol), abreviado PEG, que se ha usado ampliamente en productos farmacéuticos, en implantes artificiales y en otras aplicaciones en las que la biodisponibilidad, la falta de toxicidad y la falta de inmunogenicidad son de importancia. Las formas de realización de polímero:polipéptido descritas en el presente documento usarán PEG como polímero hidrófilo de ejemplo con la comprensión de que otros polímeros hidrófilos pueden usarse de forma similar en dichas formas de realización.
- 35 El PEG es un polímero hidrosoluble bien conocido que está disponible comercialmente o que se puede preparar mediante polimerización con apertura de anillo del etilenglicol de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica (Sandler y Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, páginas 138-161). Normalmente, el PEG es transparente, incoloro, inodoro, hidrosoluble, termoestable, inerte respecto a muchos agentes químicos, no se hidroliza ni deteriora y es, en general, no tóxico. El poli(etilenglicol) se considera biocompatible, lo que significa que el PEG es capaz de coexistir con tejidos u organismos vivos sin causar daños. Más específicamente, el PEG es sustancialmente no inmunógeno, lo que significa que el PEG no tiende a producir una respuesta inmunitaria en el cuerpo. Cuando se fija a una molécula que tiene alguna función deseable en el cuerpo, dicho agente biológicamente activo, el PEG tiende a enmascarar el agente y puede reducir o eliminar cualquier respuesta inmunitaria de modo que un organismo pueda tolerar la presencia del agente. Los conjugados de PEG tienden a no producir una respuesta inmunitaria sustancial ni causar coagulación u otros efectos no deseados.

El término "PEG" se usa ampliamente para abarcar cualquier molécula de polietilenglicol sin tener en cuenta el tamaño o la modificación en un extremo de PEG y se puede representar como unido a un polipéptido de aminoácidos no naturales mediante la fórmula:



- 50 en la que n es de 2 a 10.000 y X es H o una modificación terminal, incluidos, entre otros, un alquilo C<sub>1-4</sub>, un grupo protector o un grupo funcional terminal. El término PEG incluye, entre otros, poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluidos PEG bifuncional, PEG de múltiples ramas, PEG derivado, PEG bifurcado, PEG ramificado (teniendo cada cadena un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 50 kDa o de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 20 kDa), PEG pendiente (es decir, PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgados de la estructura polimérica) o PEG con enlaces degradables en su interior. En una forma de realización, PEG en el que n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 2000 es adecuado para usar en los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, el polímero hidrosoluble comprende un resto de poli(etilenglicol). El peso molecular del polímero puede ser de una amplia gama, incluidos, entre otros, entre aproximadamente 100 Da y

aproximadamente 100,000 Da o más. El peso molecular del polímero puede estar entre 100 Da y 100.000 Da, incluyendo 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, y 100 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero puede estar entre 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluidos, entre otros, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, y 1.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da. Un amplio abanico de moléculas de PEG se describen en, entre otros, el catálogo de Shearwater Polymers, Inc., el catálogo de Nektar Therapeutics.

Ejemplos específicos de grupos funcionales terminales en la literatura incluyen carbonato de N-succinimidilo (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.281.698, 5.468.478), amina (véase, p. ej., Buckmann y col. Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zalipsky y col. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), hidrazida (véase, p. ej., Andresz y col. Makromol. Chem. 179:301 (1978)), propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo (véase, p. ej., Olson y col. en Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; véase también la patente de EE.UU. 5.672.662), succinato de succinimidilo (véase, p. ej., Abuchowski y col. Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) y Joppich y col. Makromol. Chem. 180:1381 (1979), éster de de succinimidilo (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 4.670.417), carbonato de benzotriazol (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 5.650.234), glicidiléter (véase, p. ej., Pittha y col. Eur. J Biochem. 94:11 (1979), Elling y col., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991), oxicarbonilimidazol (véase, p. ej., Beauchamp, y col., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli y col. J. Controlled Release 1:251 (1985)), carbonato de p-nitrofenilo (véase, p. ej., Veronese, y col., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); y Sartore y col., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)), aldehído (véase, p. ej., Harris y col. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), la patente de EE.UU. n° 5.824.784, la patente de EE.UU. n° 5.252.714), maleimida (véase, p. ej., Goodson y col. Bio/Technology 8:343 (1990), Romani y col. en Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)), y Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), ortopiridil-disulfuro (véase, p. ej., Woghiren, y col. Bioconj. Chem. 4:314(1993)), acrilol (véase, p. ej., Sawhney y col., Macromolecules, 26:581 (1993)), vinilsulfona (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 5.900.461).

En algunos casos, un PEG termina en un extremo con hidroxilo o metoxi, es decir X es H o CH<sub>3</sub> ("metoxi-PEG"). Como alternativa, el PEG puede terminar con un grupo reactivo, formando de este modo un polímero bifuncional. Grupos reactivos típicos pueden incluir los grupos reactivos que normalmente se usan para reaccionar con los grupos funcionales encontrados en los 20 aminoácidos comunes (incluidos grupos maleimida, carbonatos activados (incluidos, entre otros, p-nitrofeniléster), ésteres activados (incluidos N-hidroxisuccinimida, p-nitrofeniléster) y aldehídos), así como grupos que son inertes con respecto a los 20 aminoácidos comunes pero que reaccionan de forma específica con grupos funcionales complementarios presentes en los aminoácidos no naturales para formar un grupo oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque dicha reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento), ejemplos de esto último incluyen grupos de carbonilo o dicarbonilo y de hidroxilamina.

Se ha observado que el otro extremo del PEG, que se muestra en la fórmula anterior mediante Y, se unirá directa o indirectamente a un polipéptido a través de un aminoácido no natural. Cuando Y es un grupo hidroxilamina, el reactivo PEG que contiene hidroxilamina puede reaccionar con un aminoácido no natural que contiene carbonilo o dicarbonilo en un polipéptido para formar un grupo PEG acoplado al polipéptido a través de un enlace oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). Cuando Y es un grupo carbonilo o dicarbonilo, el reactivo PEG que contiene carbonilo o dicarbonilo puede reaccionar con un aminoácido no natural que contiene hidroxilamina en un polipéptido para formar un grupo PEG acoplado al polipéptido a través de un enlace oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento).

Derivados heterobifuncionales son también particularmente útiles cuando se desea unir diferentes moléculas a cada extremo del polímero. Por ejemplo, el omega-N-amino-N-azido PEG permitiría la unión de una molécula que tiene un grupo electrófilo activado, tal como un aldehído, cetona, éster activado, carbonato activado y así sucesivamente, a un extremo del PEG y una molécula que tiene un grupo acetileno al otro extremo del PEG.

5 En algunas formas de realización, un nucleófilo fuerte (que incluye hidroxilamina) puede reaccionar con un grupo carbonilo, incluido un grupo cetona presente en un aminoácido no natural para formar una oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento), el posterior grupo oxima, en algunos casos, se puede reducir adicionalmente mediante tratamiento con un agente reductor adecuado. Como alternativa, el nucleófilo fuerte se puede  
10 incorporar en el polipéptido a través de un aminoácido no natural y usarse para reaccionar, preferentemente, con un grupo carbonilo, incluido un grupo cetona presente en el polímero hidrosoluble, para formar una oxima en presencia de un acelerador descrito en el presente documento (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En general, al menos un extremo de la molécula de PEG está disponible para la reacción con el aminoácido no natural.

15 La estructura polimérica puede ser lineal o ramificada. En general, las estructuras poliméricas ramificadas son conocidas en la técnica. Normalmente, un polímero ramificado tiene un resto central en rama central y una pluralidad de cadenas poliméricas lineales unidas al núcleo de rama central. El PEG se usa en formas ramificadas que se pueden preparar mediante la adición de óxido de etileno a varios polioles, tales como glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol y sorbitol. El resto de la rama central también puede derivar de varios aminoácidos, tal como lisina. El  
20 poli(etilenglicol) ramificado se puede representar en forma general como  $R(-PEG-OH)_m$ , en la que R deriva de un resto central, tal como glicerol, oligómeros de glicerol o pentaeritritol, y m representa el número de ramas. Las moléculas de PEG de múltiples ramas, tales como las descritas en las patentes de EE.UU. nº 5.932.462 5.643.575; 5.229.490; 4.289.872; la solicitud de patente de EE.UU. 2003/0143596; el documento WO 96/21469; y el documento WO 93/21259, también se pueden usar como la estructura polimérica.

25 El PEG ramificado también puede estar en forma de un PEG bifurcado representado por  $PEG(-YCHZ_2)_n$ , en el que Y es un grupo de enlace, n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa) y Z es un grupo terminal activado unido a CH por una cadena de átomos de longitud definida. Otra forma ramificada más, el PEG pendiente, tiene grupos reactivos, tales como carboxilo, a lo largo de la estructura de PEG en lugar de al final de las cadenas de PEG.

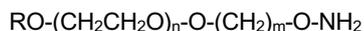
30 Con el fin de maximizar las propiedades deseadas de PEG, el peso molecular total y el estado de hidratación del polímero o polímeros de PEG unidos a la molécula biológicamente activa deben ser lo suficientemente altas como para impartir características ventajosas asociadas normalmente con la unión del polímero PEG, tal como mayor hidrosolubilidad y semivida en circulación, mientras que no afecta de forma adversa a la bioactividad de la molécula parental.

35 Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento se pueden usar para producir preparaciones sustancialmente homogéneas de conjugados polímero:proteína. "Sustancialmente homogéneo", como se usa en el presente documento, significa que se han observado que las moléculas de conjugado polímero:proteína son mayores que la mitad de la proteína total. El conjugado polímero:proteína tiene actividad biológica y las presentes preparaciones de polipéptido PEGilado "sustancialmente homogéneo" proporcionadas en el presente documento son aquéllas que  
40 son lo bastante homogéneas como para exhibir las ventajas de una preparación homogénea, por ejemplo facilidad en la aplicación clínica en la predecibilidad de la farmacocinética de un lote a otro.

Como se usa en el presente documento, y cuando se contemplan conjugados polímero:polipéptido/proteína hidrófilos, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que proporciona beneficios a un paciente. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de una serie de factores, incluidos el estado físico global del  
45 paciente y la causa subyacente de la enfermedad o afección. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad terapéuticamente eficaz de las presentes composiciones usando materiales y procedimientos disponibles para el público. Solo a modo de ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad que proporcione un incremento del hematocrito para pacientes con anemia; puede ser una cantidad que disminuya el tamaño del tumor en pacientes de cáncer; puede ser una cantidad que incremente los niveles de insulina en pacientes diabéticos; o puede  
50 ser una cantidad que disminuya el dolor en pacientes que sufren dolor crónico.

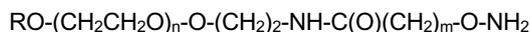
El número de polímeros hidrosolubles unidos a un polipéptido de aminoácidos no naturales (modificado) (es decir, la extensión de la PEGilación o la glicosilación) descrito en el presente documento se puede ajustar para proporcionar características alteradas (que incluye incrementos o disminuciones) farmacológicas, farmacocinéticas o farmacodinámicas, tales como la semivida *in vivo*. En algunas formas de realización, la semivida del polipéptido  
55 aumenta al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 por ciento, dos veces, cinco veces, 10 veces, 50 veces o, al menos aproximadamente 100 veces, por encima de un polipéptido no modificado.

En una forma de realización, un polipéptido que comprende un aminoácido no natural que contiene carbonilo o dicarbonilo se modifica en presencia de un acelerador, con un derivado de PEG que contiene un resto de hidroxilamina terminal que está unido directamente a la estructura de PEG, de modo que forma un enlace oxima (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento). En algunas formas de realización, el derivado de PEG con hidroxilamina terminal tendrá la estructura:



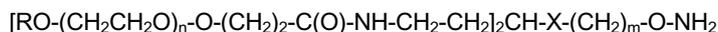
en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 40 kDa). El peso molecular del polímero puede ser de una amplia gama, incluidos, entre otros, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, y 100 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

En otra forma de realización, un polipéptido que comprende un aminoácido no natural que contiene carbonilo o dicarbonilo se modifica en presencia de un acelerador, con un derivado de PEG que contiene un resto de hidroxilamina terminal que está acoplado a la estructura de PEG por medio de un enlace amida, de modo que forma un enlace oxima (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento), acoplado además a la estructura de PEG por medio de un enlace amida. En algunas formas de realización, los derivados de PEG con hidroxilamina terminal tienen la estructura:



en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 40 kDa).

En otra forma de realización, un polipéptido que comprende un aminoácido no natural que contiene carbonilo o dicarbonilo se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene un resto de hidroxilamina terminal de modo que forma un enlace oxima (aunque tal reacción puede ser menos eficiente en ausencia de un acelerador descrito en el presente documento), teniendo cada cadena del PEG ramificado un peso molecular medio que varía de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 40 kDa y, en otras formas de realización, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 20 kDa. En algunas formas de realización, los derivados de PEG que contienen un grupo de hidroxilamina terminal tendrán la estructura:



En la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo etc.), X es, opcionalmente, NH, O, S, C(O) o no está presente, m es 2-10 y n es 100-1.000. El peso molecular del PEG de cadena ramificada puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluidos, entre otros, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, y 1.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da.

Se dispone de varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación de PEG. Véase por ejemplo, Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong y col., *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado y col., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995). Procedimientos de activación de polímeros también se pueden encontrar en el documento WO 94/17039, la patente de EE.UU. nº 5.324.844, los documentos WO 94/18247, WO 94/04193, la patente de EE.UU. nº 5.219.564, la patente de EE.UU. nº 5.122.614, el documento WO 90/13540, la patente de EE.UU. nº 5.281.698, y más en el documento WO 93/15189, y, para la conjugación entre polímeros y enzimas activados, incluidos, entre otros, el factor de coagulación VIII (documento WO 94/15625),

hemoglobina (documento WO 94/09027), la molécula transportadora de oxígeno (patente de EE.UU. nº 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese y col., App. Biochem. Biotech. 11: 141-52 (1985)).

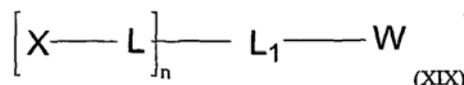
En caso necesario, los polipéptidos de aminoácidos no naturales PEGilados descritos en el presente documento obtenidos en la cromatografía hidrofóbica se puede purificar además mediante uno o más procedimientos conocidos para los expertos habituales en la técnica, incluidos, entre otros, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio de aniones o cationes (usando, incluidos, entre otros, DEAE SEFAROSA); cromatografía en sílice; HPLC de fase inversa; filtración en gel (usando, incluidos, entre otros, SEPAHDEX G-75); cromatografía de interacción hidrofóbica; cromatografía de exclusión por tamaño; cromatografía con metalquelato; ultrafiltración/diafiltración; precipitación en etanol; precipitación en sulfato amónico; cromatoenfoco; cromatografía por desplazamiento; procedimientos electroforéticos (incluidos, entre otros, enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (incluidos, entre otros, precipitación en sulfato amónico) o extracción. El peso molecular aparente se puede estimar mediante GPC por comparación con patrones de proteínas globulares (Preneta AZ, PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). La pureza del conjugado polipéptido de aminoácido no natural:PEG se puede evaluar mediante degradación proteolítica (incluidos, entre otros, escisión con tripsina), seguido de análisis por espectrometría de masas. Pepinsky RB, y col., J. Pharmacol. & Exp. Ther. 297(3):1059-66 (2001).

**D. Uso de grupos enlazadores y aplicaciones, incluidos dímeros y multímeros polipeptídicos**

Además de añadir una funcionalidad deseada directamente al polipéptido de aminoácidos no naturales, la porción de aminoácido no natural del polipéptido puede modificarse primero con una molécula enlazadora multifuncional (p. ej., bi, tri, tetra) que posteriormente se modifica adicionalmente. Es decir, al menos un extremo de la molécula enlazadora multifuncional reacciona con al menos un aminoácido no natural en un polipéptido y al menos otro extremo del enlazador multifuncional está disponible para la posterior funcionalización.

Si todos los extremos del enlazador multifuncional son idénticos, se pueden formar homomultímeros del polipéptido de aminoácidos no naturales (dependiendo de las condiciones estequiométricas). Si los extremos del enlazador multifuncional tienen distintas reactividades químicas, al menos un extremo del enlazador multifuncional puede reaccionar de modo que se una al polipéptido de aminoácidos no naturales y el otro extremo puede reaccionar después con una funcionalidad diferente, incluida, a modo de ejemplo solo, una funcionalidad deseada.

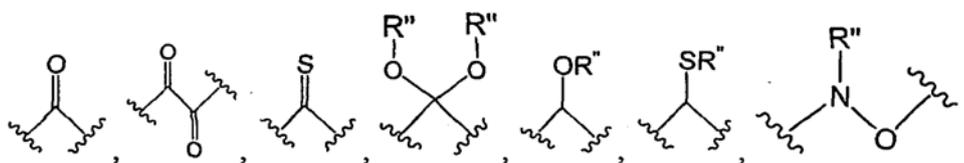
El grupo enlazador multifuncional tiene la estructura general:



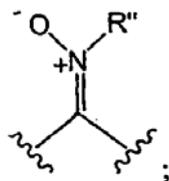
en la que:

cada X es, de forma independiente, NH<sub>2</sub>, -C(=O)R<sub>9</sub>, -SR' o -J-R, en la que R<sub>9</sub> es H u OR', cuando

J es



o



R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; cada R'' es, de forma independiente, H, alquilo, alquilo sustituido o un grupo protector, o cuando hay más de un grupo R'', dos R'' forman, opcionalmente, un heterocicloalquilo;

cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido;

cada L se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido), -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- en el que k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -O-CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(O)O-(alquileo o alquileo sustituido), -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N-, y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-;

5 L<sub>1</sub> es opcional y, cuando está presente es -C(R')<sub>p</sub>-NR'-C(O)O-(alquileo o alquileo sustituido), en la que p es 0, 1 o 2;

W es NH<sub>2</sub>, -C(=O)R<sub>9</sub>, -SR' o -J-R; y n es de 1 a 3

con la condición de que X y L-L1-W juntos, cada uno, de forma independiente, proporcionen al menos uno de los siguientes (a) un grupo hidroxilamina capaz de reaccionar con un grupo carbonilo (incluido un dicarbonilo) en un aminoácido no natural o un polipéptido de aminoácidos no naturales (modificado); (b) un grupo carbonilo (incluido un grupo dicarbonilo) capaz de reaccionar con un grupo hidroxilamina en un aminoácido no natural o un polipéptido de aminoácidos no naturales (modificado); o (c) un grupo carbonilo (incluido un grupo dicarbonilo) capaz de sufrir una reacción de intercambio con un grupo oxima en un aminoácido no natural o un polipéptido de aminoácidos no naturales (modificado).

20 En otra forma de realización o una forma de realización ilustrativa alternativa, la proporción molar de un compuesto de Fórmula (I) o de Fórmula (XIV) y del enlazador multifuncional de Fórmula (XIX) es de aproximadamente 1:2; 1:1; 1,5:1; 1,5:2; 2:1; 1:1,5; 2:1,5; o de 1,5 a 2.

Un homoenlazador bifuncional en el que el enlazador tiene dos extremos idénticos, es decir grupos de hidroxilamina, se pueden usar para formar para formar polipéptidos acoplados a través de la formación de enlaces oxima, en los que la formación de dichos polipéptidos acoplados se realiza en presencia de al menos un acelerador (aunque el enlace oxima también se puede producir a una velocidad de reacción más lenta en ausencia del acelerador). Cabe esperar que el uso de un acelerador descrito en el presente documento en la formación de dímeros y multímeros polipeptídicos y proporcione un beneficio significativo porque dicha proporción estequiométrica del enlazador y el primer polipéptido o la proporción del enlazador (primer polipéptido)-complejo y el segundo polipéptido serán más cercanas a la proporción estequiométrica en presencia del acelerador que en ausencia del acelerador (o, además, a medida que la proporción molar del acelerador aumenta, las proporciones de los reactantes mencionados anteriormente serán más próximas a la proporción estequiométrica). La proporción estequiométrica (o proporción molar) es un factor importante en la modificación de los polipéptidos por el gasto de reactivos (incluido el polipéptido y las moléculas para conjugación) y la dificultad en la purificación. Por tanto, el uso de los aceleradores proporcionados en el presente documento se puede usar para reducir los costes y los gastos resultantes de la modificación de los polipéptidos de aminoácidos no naturales, incluida la formación de dímeros o multímeros polipeptídicos, o la unión de cualquier grupo o funcionalidad deseados a un polipéptido.

40 Tal enlazador puede usarse para formar un homodímero de un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene carbonilo o dicarbonilo para formar dos enlaces oxima, uno o ambos de los cuales se forman en presencia de al menos un acelerador (aunque el enlace oxima también se puede producir a una velocidad de reacción más lenta en ausencia del acelerador. Como alternativa, si un extremo de dicho enlazador está protegido, tal enlazador parcialmente protegido se puede usar para unir el extremo de hidroxilamina no protegido a un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene carbonilo o dicarbonilo a través de un enlace oxima, dejando el otro extremo protegidos para reacciones de unión adicionales tras la desprotección. Como alternativa, la manipulación cuidadosa de la estequiometría de los reactivos puede proporcionar un resultado similar (un heterodímero), aunque será un resultado en el que el heterodímero deseado estará probablemente contaminado con algún homodímero.

50 Dicho enlazador también puede usarse para formar un homodímero de un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene hidroxilamina para formar dos enlaces oxima, uno o ambos de los cuales se forman en presencia de al menos un acelerador (aunque el enlace oxima también se puede producir a una velocidad de reacción más lenta en ausencia del acelerador. Como alternativa, si un extremo de dicho enlazador está protegido, tal enlazador parcialmente protegido se puede usar para unir el extremo de carbonilo no protegido a un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene hidroxilamina a través de un enlace oxima, dejando el otro extremo protegidos para reacciones de unión adicionales tras la desprotección. Como alternativa, la manipulación cuidadosa de la estequiometría de los reactivos puede proporcionar un resultado similar (un heterodímero), aunque será un resultado en el que el heterodímero deseado estará probablemente contaminado con algún homodímero.

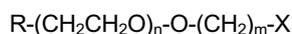
55 Se pueden usar heteroenlazadores multifuncionales en los que cada enlazador tiene más de un tipo de grupo reactivo terminal, es decir grupos hidroxilamina, oxima y tioéster, se pueden usar para formar polipéptidos acoplados mediante

la formación de al menos un enlace oxima, en el que la formación del enlace oxima se realiza en presencia de al menos un acelerador. Dicho enlazador se puede usar para formar un heterodímero de un polipéptido de aminoácidos no naturales usando la química basada en oxima estimulada con un acelerador tratada a lo largo de la presente memoria descriptiva.

5 Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento también proporcionan combinaciones de polipéptidos, tales como homodímeros, heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros (es decir, trímeros, tetrameros, etc.). Solo a modo de ejemplo, la siguiente descripción se centra en los miembros de la familia de supergenes GH, no obstante, los procedimientos, técnicas y composiciones descritos en esta sección se pueden aplicar a casi cualquier otro polipéptido que puede proporcionar beneficios en forma de dímeros y multímeros, incluidos solo a modo de ejemplo: alfa-1-antitripsina, angiostatina, factor antihemolítico, anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, apolipoproteína, apoproteína, factor natriurético auricular, polipéptido natriurético, péptido atrial, quimioquina C-X-C, T39765, NAP-2, ENA-78, gro-a, gro-b, gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG, calcitonina, ligando c-kit, citoquina, CC quimioquina, proteína 1 quimioattractiva de monocitos, proteína-2 quimioattractiva de monocitos, proteína-3 quimioattractiva de monocitos, proteína 1 alfa inflamatoria de monocitos, proteína 1 beta inflamatoria de monocitos, RANTES, 1309, R83915, R91733, HCCI, T58847, D31065, T64262, CD40, ligando CD40, ligando c-kit, colágeno, factor estimulante de colonias (CSF), factor del complemento 5a, inhibidor del complemento, receptor del complemento 1, citoquina, péptido 78 epitelial activador de neutrófilos, MIP-16, MCP-1, factor de crecimiento epidérmico (EGF), péptido epitelial activador de neutrófilos, eritropoyetina (EPO), toxina exfoliante, Factor IX, Factor VII, Factor VIII, Factor X, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), fibrinógeno, fibronectina, proteína del haz de cuatro hélices, GCSF, glp-1, GM-CSF, glucocerebrosidasa, gonadotropina, factor de crecimiento, receptor del factor de crecimiento, grf, proteína hedgehog, hemoglobina, factor de crecimiento de hepatocitos (hGF), hirudina, hormona de crecimiento humana (hGH), seroalbúmina humana, ICAM-1, receptor de ICAM-1, LFA-1, receptor de LFA-1, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), IGF-I, IGF-II, interferón (IFN), IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, cualquier molécula similar al interferón o miembro de la familia de los IFN, interleucina (IL), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), lactoferrina, factor inhibidor de leucemia, luciferasa, neurturina, factor inhibidor de neutrófilos (NIF), oncostatina M, proteína osteogénica, producto de oncogenes, paracitonina, hormona paratiroidea, PD-ECSF, PDGF, hormona peptídica, pleiotropina, proteína A, proteína G, pth, exotoxina a pirogénica, exotoxina B pirogénica, exotoxina C pirogénica, pyy, relaxina, renina, SCF, proteína biosintética pequeña, receptor I soluble del complemento, I-CAM 1 soluble, receptor soluble de interleucina, receptor soluble de TNF, somatomedina, somatostatina, somatotropina, estreptoquinasa, superantígenos, enterotoxina de estafilococos, enterotoxina, FLT, SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, receptor de hormonas esteroideas, superóxido dismutasa, toxina del síndrome del shock tóxico, timosina alfa 1, activador del plasminógeno tisular, factor de crecimiento tumoral (TGF), factor de necrosis tumoral, factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de necrosis tumoral, receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), proteína VLA-4, proteína VCAM-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), uroquinasa, mos, ras, raf, met, p53, tat, fos, myc, jun, myb, rel, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, receptor de testosterona, receptor de aldosterona, receptor de LDL y corticosterona. El polipéptido de aminoácidos no naturales puede también ser homólogo a cualquier polipéptido miembro de la familia de supergenes de la hormona de crecimiento.

Por tanto, dentro de los procedimientos, técnicas y composiciones descritos en el presente documento se encuentra un polipéptido miembro de la familia de supergenes GH que contiene uno o más aminoácidos no naturales unido a otro miembro de la familia de supergenes GH, o una variante del mismo o a cualquier otro polipéptido que no sea un miembro de la familia de supergenes GH o a una variante del mismo, bien directamente a la estructura del polipéptido o bien a través de un enlazador. Debido a su mayor peso molecular en comparación con los monómeros, los conjugados diméricos o multiméricos del miembro de la familia de supergenes GH pueden exhibir nuevas propiedades o propiedades deseables, incluidas, entre otras, diferentes propiedades farmacológicas, farmacocinéticas, farmacodinámicas, semivida terapéutica modulada o semivida en plasma modulada con respecto al miembro de la familia de supergenes GH. En otras formas de realización, los dímeros del miembro de la familia de supergenes GH descritos en el presente documento modularán la dimerización del receptor del miembro de la familia de supergenes GH. En otras formas de realización, los dímeros o multímeros del miembro de la familia de supergenes GH descritos en el presente documento actuarán como antagonista, agonista o modulador del receptor del miembro de la familia de supergenes GH.

En algunas formas de realización, los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento proporcionarán multímeros que comprenden uno o más miembros de la familia de supergenes GH formados mediante reacciones con polímeros hidrosolubles activados que tienen la estructura:



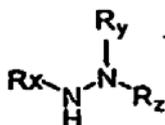
55 en la que n es de aproximadamente 5 a 3.000, m es 2-10, X puede ser un resto que contiene hidroxilamina o carbonilo o dicarbonilo, y R es un grupo de sellado, un grupo funcional o un grupo saliente que puede ser igual o diferente de X. r puede ser, por ejemplo, un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, N-hidroxisuccinimidiléster, 1-benzotriazoliléster, carbonato de N-hidroxisuccinimidilo, carbonato de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa,

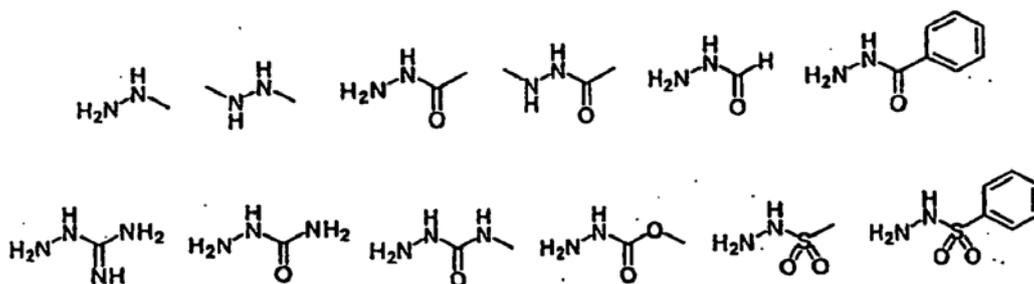
gamina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxico, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos y tresilato, alqueno y cetona.

5 Usando la química detallada a lo largo de la presente memoria descriptiva, un experto habitual en la técnica podría diseñar un ligador en el que al menos un grupo funcional puede formar un grupo oxima, en presencia del acelerador divulgado en el presente documento, con un polipéptido de aminoácidos no naturales; los otros grupos funcionales en el enlazador podrían usar otra química conocida, incluida la química basada en nucleófilo/electrófilo bien conocida en la técnica de la química orgánica.

10 La formación de un dímero o multímero polipeptídico unidos a través de un grupo oxima de (a) la reacción de un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene hidroxilamina y un reactivo que contiene carbonilo, o (b) la reacción de un polipéptido de aminoácidos no naturales que contiene carbonilo y un reactivo que contiene hidroxilamina se puede potenciar mediante la adición de un acelerador a la mezcla de reacción. Dicho acelerador es un compuesto que tiene al menos una de las propiedades siguientes: (a) incrementa la velocidad de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que el incremento de la velocidad es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (b) disminuye la energía de activación de la reacción entre un compuesto que contiene carbonilo y un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la energía de activación es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (c) incrementa el rendimiento de un compuesto que contiene oxima de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina, en el que el incremento del rendimiento es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (d) disminuye la temperatura a la cual un compuesto que contiene carbonilo reacciona con compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de la temperatura es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (e) disminuye el tiempo necesario para reaccionar un compuesto que contiene carbonilo reacciona con compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución del tiempo es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (f) disminuye la cantidad de reactivos necesaria para formar un compuesto oxima en un polipéptido de aminoácidos no naturales, en el que la disminución de la cantidad de reactivos es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (g) disminuye los productos secundarios resultantes de la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar un compuesto que contiene oxima, en el que la disminución de los productos secundarios es respecto a la reacción en ausencia del acelerador; (h) no destruye de forma irreversible la estructura terciaria de un polipéptido sometido a una reacción de formación de oxima en presencia de un acelerador (a excepción de, por supuesto, cuando el fin de la reacción es destruir dicha estructura terciaria); (i) se puede separar de un compuesto que contiene oxima *al vacío*; y (j) modula la reacción de un compuesto que contiene carbonilo con un compuesto que contiene hidroxilamina. En otras formas de realización, el acelerador tiene al menos dos de las propiedades mencionadas con anterioridad, tres de las propiedades mencionadas con anterioridad, cuatro de las propiedades mencionadas con anterioridad, cinco de las propiedades mencionadas con anterioridad, seis de las propiedades mencionadas con anterioridad, siete de las propiedades mencionadas con anterioridad, ocho de las propiedades mencionadas con anterioridad, nueve de las propiedades mencionadas con anterioridad o todas las propiedades mencionadas con anterioridad. En una forma de realización adicional, el acelerador no tiene ninguna de las propiedades mencionadas con anterioridad.

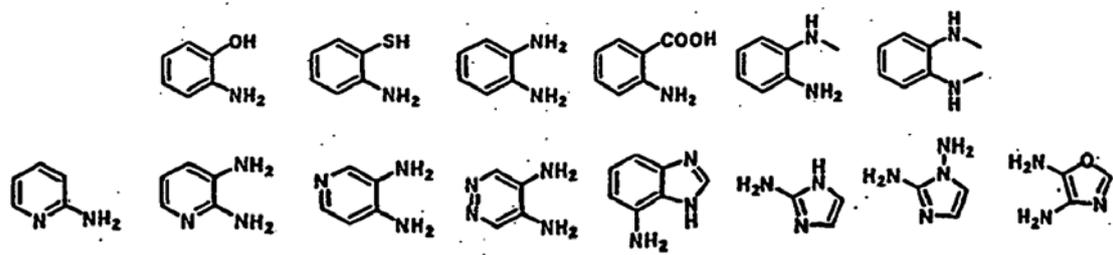
40 El uso de un acelerador incluye el uso de un único acelerador o múltiples aceleradores. Además, la proporción molar entre el acelerador y el compuesto que contiene carbonilo incluye valores entre aproximadamente 0,5:1 a 5000:1, incluidos, únicamente a modo de ejemplo, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, y 0,5:1. Además, la proporción molar entre el acelerador y el compuesto que contiene hidroxilamina incluye valores entre aproximadamente 0,5:1 a 5000:1, incluidos, solo a modo de ejemplo, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, y 0,5:1. Además, el acelerador incluye compuestos que sustancialmente se pueden eliminar *al vacío* del compuesto que contiene oxima resultante. Además, el acelerador incluye compuestos que contienen un resto de diamina, un resto de semicarbazida, una hidrazina o un resto de hidrazida. Además, en cualquiera de los aspectos o formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador se selecciona del grupo que consiste en aminas aromáticas bifuncionales, derivados de oxoamina y compuestos que tienen las estructuras siguientes:





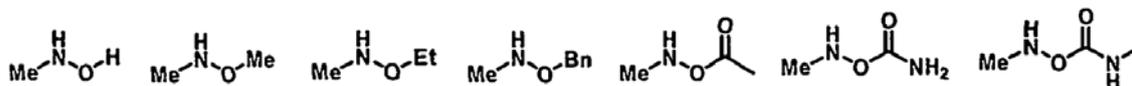
5 en las que  $R_x$ ,  $R_y$  y  $R_z$  se seleccionan del grupo que consiste en:  $L_x$ -H,  $L_x$ -alquilo,  $L_x$ -arilo,  $L_x$ -heteroarilo,  $L_x$ -alquenoilo,  $L_x$ -alquinilo,  $L_x$ -alcoxi y  $L_x$ -alquilamina, en los que  $L_x$  es un enlace, C(=O), C(=NH) y C(=NH)-NH y SO, SO<sub>2</sub>, en los que la amina aromática se selecciona del grupo:

#### Aminas aromáticas bifuncionales:

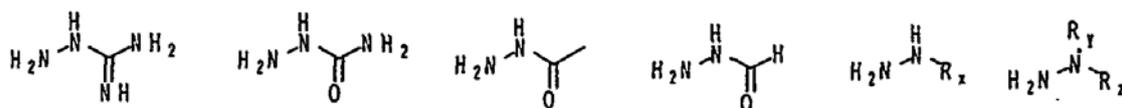


y en las que el derivado de oxoamina se selecciona del grupo:

#### 10 Derivados de oxoamina:



Además, el acelerador incluye compuestos seleccionados del grupo que consiste en:



15 en las que  $R_x$ ,  $R_y$  y  $R_z$  se seleccionan del grupo que consiste en:  $L_x$ -H,  $L_x$ -alquilo,  $L_x$ -arilo,  $L_x$ -heteroarilo,  $L_x$ -alquenoilo,  $L_x$ -alquinilo, n-alcoxi y n-alquilamina, en los que  $L_x$  es un enlace, C(=O), C(=NH) y C(=NH)-NH. Además, en cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador se selecciona de los compuestos presentados en las FIG. 5, FIG. 9 o FIG. 10, incluidos, a modo de ejemplo, cualquiera de los compuestos 6, 8, 10, 7 y 20 de la Figura 5. En cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el acelerador incluye un agente que puede formar una hidrazona tras la reacción con un grupo que contiene carbonilo. Además, en cualquiera de los aspectos mencionados con anterioridad, la actividad del acelerador depende de la velocidad de la reacción con el resto de cetona y la estabilidad del intermedio resultante. Además, en cualquiera de los aspectos y formas de realización mencionados con anterioridad, el pH de la mezcla de reacción que comprende el acelerador, el compuesto que contiene carbonilo y el compuesto que contiene hidroxilamina está entre aproximadamente 2,0 y 10; entre aproximadamente 2,0 y 9,0; entre aproximadamente 2,0 y 8,0; entre aproximadamente 3,0 y 7,0; entre aproximadamente 4,0 y 6,0; entre 3,0 y 10,0; entre aproximadamente 4,0 y 10,0; entre aproximadamente 3,0 y 9,0; entre aproximadamente 3,0 y 8,0; entre aproximadamente 2,0 y 7,0; entre aproximadamente 3,0 y 6,0; entre aproximadamente 4,0 y 9,0; entre aproximadamente 4,0 y 8,0; entre aproximadamente 4,0 y 7,0; entre aproximadamente 4,0 y 6,5; entre aproximadamente 4,5 y 6,5; aproximadamente 4,0; aproximadamente 4,5; aproximadamente 5,0; aproximadamente 5,5; aproximadamente 6,0; aproximadamente 6,5; y aproximadamente 7,0.

#### 30 Expresión en sistemas alternativos

Se han empleado varias estrategias para introducir aminoácidos no naturales en proteínas en células huésped no recombinantes, células huésped mutagenizadas o en sistemas acelulares. Estos sistemas también son adecuados

para usar en la preparación de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento. La obtención mediante derivación de aminoácidos con cadenas laterales reactivas, tales como Lys, Cys y Tyr, dio como resultado la conversión de lisina en N<sub>2</sub>-acetil-lisina. La síntesis química también proporciona un procedimiento directo para incorporar aminoácidos no naturales. Con el reciente desarrollo de la unión enzimática y la unión química nativa de fragmentos peptídicos, es posible fabricar proteínas más grandes. Véase, por ejemplo, P. E. Dawson y S. B. H. Kent, Annu. Rev. Biochem, 69:923 (2000). La unión química de péptidos y la unión química nativa se describen en la patente de EE.UU. n° 6.184.344, la publicación de patente de EE.UU. 2004/0138412, la publicación de patente de EE.UU. 2003/0208046, el documento WO 02/098902 y el documento WO 03/042235, que se incorporan en el presente documento por referencia. Se ha usado un procedimiento biosintético general *in vitro* en el que un ARNt supresor químicamente acilado con el aminoácido no natural deseado se añade a un extracto *in vitro* capaz de soportar la biosíntesis de proteínas, para incorporar de un modo específico de sitio en 100 aminoácidos no naturales en una diversidad de proteínas de prácticamente cualquier tamaño. Véase, por ejemplo, V. W. Cornish, D. Mendel y P. G. Schultz, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1995, 34:621 (1995); C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, A general method for site-specific incorporation of non-natural amino acids into proteins, Science 244:182-188 (1989); y, J.D. Bain, C.G. Glabe, TA. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Diala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, J. Am. Chem. Soc. 111:8013-8014 (1989). Un amplio abanico de grupos funcionales se ha introducido en proteínas para estudios de estabilidad proteica, plegamiento de proteínas, mecanismos enzimáticos y transducción de señal.

Un procedimiento *in vivo*, denominado incorporación a presión selectiva, se desarrolló para explotar la promiscuidad de las sintetasas silvestres. Véase, por ejemplo, N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder y R. Huber, FASEB J., 13:41 (1999). Una cepa auxótrofa en la que se apaga la vía metabólica relevante que suministra la célula con un aminoácido natural concreto se cultiva en medio mínimo que contiene concentraciones limitadas del aminoácido natural, mientras que se suprime la transcripción del gen diana. Al principio de una fase de crecimiento estacionaria, el aminoácido natural se depleciona y se sustituye con el análogo aminoácido no natural. La inducción de la expresión de proteínas recombinantes tiene como resultado la acumulación de una proteína que contiene el análogo no natural. Por ejemplo, usando esta estrategia se han incorporado o, m y p-fluorofenilalaninas en las proteínas y exhiben dos hombros característicos en el espectro UV que se pueden identificar fácilmente, véase, por ejemplo, C. Minks, R. Huber, L. Moroder y N. Budisa, Anal. Biochem. 284:29 (2000); se ha usado trifluorometionina para reemplazar la metionina en la lisozima del bacteriófago T4 para estudiar su interacción con los ligandos de chitoooligosacárido mediante RMN de <sup>19</sup>F, véase, por ejemplo, H. Dewel, E. Daub, V. Robinson y J. F. Honek, Biochemistry, 36:3404 (1997); y se ha incorporado trifluoroleucina en lugar de leucina, teniendo como resultado un incremento de la estabilidad térmica y química de una proteína de tipo cremallera de leucina. Véase, por ejemplo, Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado and D. A. Tirrell, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 40:1494 (2001). Además, se incorporan selenometionina y telurometionina en varias proteínas recombinantes para facilitar la solución de fases en cristalografía de rayos X. Véase, por ejemplo, W. A. Hendrickson, J. R. Horton y D. M. Lemaster, EMBO J. 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Rankle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda y M. Hatada, Nat. Struct. Biol., 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann y R. Huber, Eur. J. Biochem., 230:788 (1995); y, N. Budisa, W. Kambrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeind, L. Moroder and R. Huber, J. Mol. Biol., 270:616 (1997). También se han incorporado con eficacia análogos de metionina con funcionalidades de alqueno o alquino, permitiendo la modificación adicional de proteínas por medios químicos. Véase, por ejemplo, J. C. van Hest y D. A. Tirrell, FEBS Lett., 428:68 (1998); J. C. van Hest, K. L. Kiick y D. A. Tirrell, J. Am. Chem. Soc., 122:1282 (2000); y, K. L. Kück y D. A. Tirrell, Tetrahedron, 56:9487 (2000); la patente de EE.UU. n° 6.586.207; la publicación de patente de EE.UU. 2002/0042097.

El éxito de este procedimiento depende del reconocimiento de los análogos de aminoácidos no naturales por las aminoacil-ARNt-sintetasas, que, en general, requieren una elevada selectividad para asegurar la fidelidad de la traducción de proteínas. Un modo de expandir el alcance de este procedimiento es relajar la especificidad del sustrato de las aminoacil-ARNt-sintetasas, lo que se ha conseguido en un número limitado de casos. Por ejemplo, la sustitución de Ala<sup>294</sup> por Gly en la fenilalanil-ARNt-sintetasa (PheRS) de *Escherichia coli* aumenta el tamaño de la ranura de unión al sustrato y tiene como resultado la acilación de ARNtPhe por p-Cl-fenilalanina (p-Cl-Phe). Véase, M. Ibba, P. Kast and H. Hennecke, Biochemistry, 33:7107 (1994). Una cepa de *Escherichia coli* que aloja este PheRS mutante permite la incorporación de p-Cl-fenilalanina o p-Br-fenilalanina en lugar de fenilalanina. Véase, por ejemplo, M. Ibba and H. Hennecke, FEBS Lett., 364:272 (1995); y N. Sharma, R. Furter, P. Kast and D. A. Tirrell, FEBS Lett., 467:37 (2000). De forma similar, se ha mostrado que una mutación puntual Phe130Ser cerca del sitio de unión del aminoácido de la tirosil-ARNt-sintetasa de *Escherichia coli* permite la incorporación de azatirosina con más eficiencia que tirosina. Véase, F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soll y S. Nishimura, J. Biol. Chem., 275:40324 (2000).

Otra estrategia para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas *in vivo* es modificar las sintetasas que tienen mecanismos de comprobación de lectura. Estas sintetasas no pueden discriminar y, por tanto activan aminoácidos que son estructuralmente similares a los aminoácidos naturales conocidos. Este error se corrige en un sitio distinto, que desacila el aminoácido del ARNt cargado por error para mantener la fidelidad de la traducción proteica. Si la actividad

de comprobación de lectura de la sintetasa se desactiva, los análogos estructurales activados por error pueden escapar a la función de edición y ser incorporados. Este enfoque se ha demostrado recientemente con la valil-ARNt-sintetasa (ValRS). Véase, V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel y P. Marliere, *Science*, 292:501 (2001). La ValRS puede aminoacilar por error ARNtVal con Cys, Thr o aminobutirato (Abu); estos aminoácidos no conocidos se hidrolizan después mediante el dominio de edición. Después de la mutagénesis aleatoria del cromosoma de *Escherichia coli* se seleccionó una cepa de *Escherichia coli* que tiene una mutación en el sitio de edición de ValRS. Esta ValRS defectiva en la edición carga de forma incorrecta ARNtVal con Cys. Dado que Abu se asemeja estéricamente a la Cys (el grupo -SH de la Cys está reemplazado con -CH<sub>3</sub> en Abu), la ValRS mutante también incorpora Abu en las proteínas cuando esta cepa mutante de *Escherichia coli* se cultiva en presencia de Abu. El análisis de espectrometría de masas muestra que aproximadamente el 24% de las valinas está sustituido por Abu en cada posición de valina en la proteína nativa.

La síntesis en fase sólida y los procedimientos semisintéticos también han permitido la síntesis de una serie de proteínas que contienen aminoácidos no naturales. Por ejemplo, véanse las publicaciones y referencias siguientes citadas, que son las siguientes: Crick, F.H.C., Barrett, L. Brenner, S. Watts-Tobin, R. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192:1227-1232 (1961); Hofmann, K., Bohn, H. Studies on polypeptides. XXXVI. The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment, *J. Am Chem*, 88(24):5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes, *Acc Chem Res*, 22:47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin, *J Am Chem Soc*, 109:3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S B H. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease, *Science*, 256(5054):221-225 (1992); Chaiken, I.M. Semisynthetic peptides and proteins, *CRC Crit Rev Biochem*, 11(3):255-301 (1981); Offord, R.E. Protein engineering by chemical means? *Protein Eng.*, 1(3):151-157 (1987); and, Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J., Wells, J.A. A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with Non-natural Catalytic Residues, *Science*, 266(5183):243 (1994).

Se ha usado modificación química para introducir diversas cadenas laterales no naturales, incluidos cofactores, marcadores de espín y oligonucleótidos en proteínas in vitro. Véase, por ejemplo, Corey, D.R., Schultz, P.G. Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease, *Science*, 238(4832):1401-1403 (1987); Kaiser, E.T., Lawrence D.S., Rokita, S.E. The Chemical modification of enzymatic specificity, *Annu Rev Biochem*, 54:565-595 (1985); Kaiser, E.T., Lawrence, D.S. Chemical mutation of enzyme active sites, *Science*, 226(4674):505-511 (1984); Neet, K.E., Nanci A, Koshland, D.E. Properties of thiol-subtilisin, *J Biol. Chem*, 243(24):6392-6401 (1968); Polgar, L. et M.L. Bender. A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. *J. Am Chem Soc*, 88:3153-3154 (1966); y, Pollack, S.J., Nakayama, G. Schultz, P.G. Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites, *Science*, 242(4881):1038-1040 (1988).

Como alternativa, se han usado procedimientos biosintéticos que emplean aminoacil-ARNt químicamente modificados para incorporar varias sondas biofísicas en proteínas sintetizadas in vitro. Véanse las siguientes publicaciones y referencias citadas en: Brunner, J. New Photolabeling and crosslinking methods, *Annu. Rev Biochem*, 62:483-514 (1993); y, Krieg, U.C., Walter, P., Hohnson, A.E. Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54 kilodalton polypeptide of the signal recognition particle, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 83(22):8604-8608(1986).

Anteriormente se ha demostrado que los aminoácidos no naturales pueden incorporarse de forma específica de sitio en proteínas in vitro mediante la adición de ARNt supresores químicamente aminoacilados a reacciones de síntesis de proteínas programadas con un gen que contiene una mutación ámbar sin sentido deseada. Usando estos enfoques, se puede sustituir una serie de los veinte aminoácidos comunes con homólogos de estructura similar, por ejemplo fluorofenilalanina por fenilalanina, usando cepas auxotróficas para un aminoácido concreto. Véase, por ejemplo, Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. A general method for site-specific incorporation of non-natural amino acids into proteins, *Science*, 244: 182-188 (1989); M.W. Nowak, y col., *Science* 268:439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am Chem Soc*, 111:8013-8014 (1989); N. Budisa y col., *FASEB J*. 13:41-51 (1999); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. Biosynthetic method for introducing non-natural amino acids site-specifically into proteins, *Methods in Enz.*, vol. 202, 301-336 (1992); y, Mendel, D., Cornish, V.W. & Schultz, P.G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct*. 24, 435-62 (1995).

Las patentes siguientes se citan para procedimientos in vivo para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas y otros polipéptidos y para procedimientos para producir sintetasa/ARNt adecuadas: Las patentes de EE.UU. números 7.045.337 y 7.083.970.

Por ejemplo, se preparó un ARNt supresor que reconocía el codón de terminación UAG y se aminoaciló químicamente con un aminoácido no natural. Se usó mutagénesis dirigida a sitio convencional para introducir el codón de terminación TAG en el sitio de interés en el gen de la proteína. Véase, por ejemplo, Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res*, 16(3):791-802 (1988). Cuando el ARNt supresor acilado y el gen mutante se combinaron en un sistema de transcripción/traducción in

vitro, se incorporó el aminoácido no natural en respuesta al codón UAG, que dio una proteína que contenía dicho aminoácido en la posición especificada. Experimentos usando [<sup>3</sup>H]-Phe y experimentos con α-hidroxiácidos demostraron que sólo el aminoácido deseado se incorpora en la posición especificada por el codón UAG y que este aminoácido no se incorpora en ningún otro sitio en la proteína. Véase, por ejemplo, Noren, y col, supra; Kobayashi et y col., (2003) Nature Structural Biology 10(6):425-432; and, Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, Science, 255(5041):197-200 (1992).

Un ARNt se puede aminoacilar con un aminoácido deseado mediante cualquier procedimiento o técnica, incluidas, entre otras, aminoacilación química o enzimática.

La aminoacilación se puede conseguir mediante aminoacil ARNt sintetasas o mediante otras moléculas enzimáticas, incluidas, entre otras, ribozimas. El término "ribozima" es intercambiable con "ARN catalítico". Cech y col. (Cech, 1987, Science, 236:1532-1539; McCorkle y col., 1987, Concepts Biochem. 64:221-226) demostraron la presencia de ARN naturales que pueden actuar como catalizadores (ribozimas). No obstante, aunque se ha demostrado estos catalizadores de ARN naturales sólo actúan sobre sustratos de ácido ribonucleico para escisión y corte y empalme, el reciente desarrollo de la evolución artificial de ribozimas ha ampliado la potencial catálisis a varias reacciones químicas. En estudios se han identificado moléculas de ARN que pueden catalizar enlaces aminoacil-ARN en sus propios extremos (2')3' (Illangakere y col., 1995 Science 267: 643-647), y una molécula de ARN que puede transferir un aminoácido desde una molécula de ARN a otra (Lohse y col., 1996, Nature 381:442-444).

La publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2003/0228593, que se incorpora en el presente documento por referencia, describe procedimientos para construir ribozimas y su uso en la aminoacilación de ARNt con aminoácidos codificados de forma natural y no naturales. Las formas inmovilizadas en sustrato de moléculas enzimáticas que puede aminoacilar ARNt, entre las que se incluyen las ribozimas, pueden permitir una eficiente purificación por afinidad de los productos aminoacilados. Ejemplos de sustratos adecuados incluyen agarosa, sefarosa y perlas magnéticas. La producción y uso de una forma de ribozima inmovilizada en sustrato para aminoacilación se describe en Chemistry and Biology 2003, 10:1077-1084 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2003/0228593

Los procedimientos de aminoacilación química incluyen los introducidos por Hecht y col. (Hecht, S. M. Acc. Chem. Res. 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. Biochemistry 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. J. Biol. Chem 1978, 253, 4517) and by Schultz, Chamberlin, Dougherty y otros (Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; Ellman, J. A.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 2722; Noren, C. J., Anthony Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. Science 1989, 244, 182; Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8013; Bain, J. D. y col. Nature 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. Chem. Biol. 1997, 4, 740; Turcatti, y col. J. Biol. Chem. 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. y col. Science, 1995, 268, 439; Saks, M. E. y col. J. Biol. Chem. 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. y col. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34), para evitar el uso de sintetasas en la aminoacilación. Dichos procedimientos y otros procedimientos de aminoacilación química se pueden usar para aminoacilar moléculas de ARNt descritas en el presente documento.

Los procedimientos para generar ARN catalítico pueden implicar generar grupos distintos de secuencias de ribozimas aleatorizadas, realizando evolución dirigida en los grupos, detección selectiva en los grupos según la actividad de aminoacilación deseada y seleccionando secuencias de las ribozimas que exhiba la actividad de aminoacilación deseada.

Las ribozimas pueden comprender motivos y/o regiones que facilitan la actividad de acilación, tal como un motivo GGU u una región rica en U. Por ejemplo, se ha comunicado que las regiones ricas en U pueden facilitar el reconocimiento de un sustrato aminoácido y un motivo GGU puede formar pares de bases con el extremo 3' de un ARNt. En combinación, el motivo GGU y la región rica en U facilitan el reconocimiento simultáneo del aminoácido y el ARNt simultáneamente y, de este modo, facilitan la aminoacilación del extremo 3' del ARNt.

Las ribozimas se pueden generar mediante selección *in vitro* usando un r24mini parcialmente aleatorizado conjugado con ARN<sup>Asn</sup><sub>CCG</sub>, seguido de ingeniería sistemática de una secuencia consenso encontrada en los clones activos. Una ribozima ejemplo obtenida mediante este procedimiento se denomina "ribozima Fx3" y se describe en la solicitud de publicación de EE.UU. n° 2003/0228593, actúa como catalizador versátil para la síntesis de varios aminoacil-ARNt cargados con aminoácidos no naturales conocidos.

Las ribozimas de ARNt aminoacilados se pueden inmovilizar sobre un sustrato para permitir de este modo una purificación por afinidad eficiente de los ARNt aminoacilados. Ejemplos de sustratos adecuados incluyen, entre otros, agarosa, sefarosa y perlas magnéticas. La ribozimas pueden inmovilizarse sobre resinas aprovechando la estructura química del ARN, de modo que el 3'-cis-diol sobre la ribosa del ARN se pueda oxidar con peryodato para dar el correspondiente dialdehído para facilitar la inmovilización del ARN sobre la resina. Se pueden usar varios tipos de resinas, incluidas las baratas resinas de hidrazida en las que la aminación reductora hace de la interacción entre la resina y la ribozima un enlace irreversible. La síntesis de aminoacil-ARNt se puede facilitar significativamente mediante

esta técnica de aminoacilación en columna. Kourouklis y col. *Methods* 2005; 36:239-4 describen un sistema de aminoacilación basado en columna.

El aislamiento de los ARNt aminoacilados se puede conseguir de diferentes formas. Un procedimiento adecuado es eluir los ARNt aminoacilados de una columna con un tampón, tal como solución de acetato sódico con EDTA 10 mM, un tampón que contiene N-(2-hiroxil)piperazin-N'-(3-ácido propanosulfónico) 50 mM, KCl 12,5 mM, a pH 7,0, EDTA 10 mM, o simplemente agua tamponada con EDTA (pH 7,0)

Los ARNt aminoacilados se pueden añadir a reacciones de traducción con el fin de incorporar el aminoácido con el que se aminoaciló el ARNt en una posición de elección en un polipéptido construido mediante la reacción de traducción. Ejemplos de sistemas de traducción en los que se pueden usar los ARNt aminoacilados descritos en el presente documento incluyen, entre otros, lisados celulares. Los lisados celulares proporcionan los componentes de la reacción necesarios para la traducción in vitro de un polipéptido a partir de un ARNm. Ejemplos de dichos componentes de la reacción incluyen, entre otros, proteínas ribosómicas, ARNr, aminoácidos, ARNt, GTP, ATP, factores de iniciación y elongación de la traducción y factores adicionales asociados con la traducción. De forma adicional, los sistemas de traducción pueden ser traducciones discontinuas o traducción compartimentalizada. Los sistemas de traducción discontinua combinan los componentes de la reacción en un único compartimento, mientras que los sistemas de traducción compartimentalizada separan los componentes de la reacción de traducción de los productos de la reacción que pueden inhibir la eficiencia de la traducción. Dichos sistemas de traducción están disponibles comercialmente.

Además, se puede usar un sistema de acoplamiento de transcripción/traducción. Los sistemas de acoplamiento de transcripción/traducción permiten la transcripción de un ADN entrante en un correspondiente ARNm, que, a su vez, es traducido por los componentes de la reacción. Un ejemplo de una transcripción/traducción acoplados comercialmente disponible es el Sistema de Traducción Rápida (RTS, Roche Inc.). El sistema incluye una mezcla que contiene lisado de *E. coli* para proporcionar los componentes de la traducción, tales como ribosomas y factores de traducción. De forma adicional, se incluye una ARN polimerasa para la transcripción del ADN entrante en un molde de ARNm para usar en la traducción. El RTS puede usar compartimentalización de los componentes de la reacción mediante una membrana interpuesta entre los compartimentos de la reacción, incluyendo un compartimento de suministro/residuos y un compartimento de transcripción/traducción.

Otros agentes pueden realizar la aminoacilación de los ARNt, incluidos, entre otros, transferasas, polimerasas, anticuerpos catalíticos, proteínas multifuncionales y similares.

Stephan en *Scientist* 2005 Oct 10; páginas 30-33 describe procedimientos adicionales para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas. Lu y col. en *Mol Cell*. 2001 Oct;8(4):759-69 describen un procedimiento en el que una proteína se une químicamente a un péptido sintético que contiene aminoácidos no naturales (unión de la proteína expresada).

También se han usado técnicas de microinyección para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas. Véase, por ejemplo, M. W. Nowak, P. C. Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty y H. A. Lester, *Science*, 268:439 (1995); y, D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:645 (2000). En un oocito de *Xenopus* se co-inyectaron dos especies de ARN construidas in vitro: Un ARNm que codificaba la proteína diana con un codón de terminación UAG en la posición del aminoácido de interés y un ARNt supresor ámbar aminoacilado con el aminoácido no natural deseado. La maquinaria de la traducción del oocito inserta después el aminoácido no natural en la posición especificada por UAG. Este procedimiento ha permitido estudios de estructura-función in vivo de proteínas integrales de membrana, que, en general, no son susceptibles a los sistemas de expresión in vitro. Ejemplos incluyen la incorporación de un aminoácido fluorescente en el receptor de taquinina neuroquinina-2 para medir las distancias mediante transferencia de energía de resonancia fluorescente, véase, por ejemplo, G. Turcatti, K. Nemeth, M. D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel and A. Chollet, *J. Biol. Chem.*, 271:19991 (1996); la incorporación de aminoácidos biotinilados para identificar residuos expuestos en la superficie en canales iónicos, véase, por ejemplo, J. P. Gallivan, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *Chem. Biol.*, 4:739 (1997); el uso de análogos de tirosina enjaulada para monitorizar los cambios conformacionales en un canal iónico en tiempo real, véase, por ejemplo, J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty and H. A. Lester, *Neuron*, 20:619 (1998); y el uso de alga hidroxiaminoácidos para cambiar las estructuras de los canales iónicos para sondar sus mecanismos de apertura. Véase, por ejemplo, P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty and H. A. Lester, *Cell*, 96:89 (1999); y, T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz y J. Yang, *Nat. Neurosci.*, 4:239 (2001).

La capacidad para incorporar aminoácidos no naturales directamente en proteínas in vivo ofrece una amplia variedad de ventajas, que incluyen, solo a modo de ejemplo, rendimientos altos de proteínas mutantes, facilidad técnica, potencial para estudiar la proteína mutante en células o, posiblemente, en organismos vivos, y el uso de estas proteínas mutantes en tratamientos terapéuticos y usos diagnósticos. La capacidad de incluir en las proteínas aminoácidos no naturales con varios tamaños, acideces, nucleofilicidades, hidrofobicidades y otras proteínas pueden expandir mucho nuestra capacidad para manipular racional y sistemáticamente las estructuras de las proteínas, para sondar la función proteica y crear nuevas proteínas u organismos con propiedades nuevas.

En un intento de incorporar de forma específica de sitio para-F-Phe, se usó un par de ARNtPheCUA supresor ámbar/fenilalanil-ARNt sintetasa en una cepa de *Escherichia coli* resistente a p-F-Phe auxotrófica para Phe. Véase, por ejemplo, R. Furter, Protein Sci., 7:419 (1998).

También puede ser posible obtener la expresión de un polipéptido de aminoácidos no naturales descrito en el presente documento usando un sistema de traducción acelular (in vitro) Los sistemas de traducción pueden ser celulares o acelulares, y pueden ser procariotas o eucariotas. Los sistemas de traducción celular incluyen, entre otros, preparaciones de células enteras tales como células permeabilizadas o cultivos celulares en los que una secuencia de ácido nucleico deseada se puede transcribir a ARNm y traducir este ARNm. Los sistemas de traducción acelulares están disponibles comercialmente y se conocen bien diferentes tipos y sistemas. Ejemplos de sistemas acelulares incluyen, entre otros, lisados procarióticos tales como lisados de *Escherichia coli*, y lisados eucarióticos, tales como extractos de germen de trigo, lisados de células de insectos, lisados de reticulocitos de conejo, lisados de oocitos de conejo y lisados de células humanas. Se pueden preferir extractos o lisados eucarióticos cuando la proteína resultante está glicosilada, fosforilada o, de otro modo, modificada porque muchas de estas modificaciones sólo son posibles en sistemas eucarióticos. Algunos de estos extractos y lisados están disponibles comercialmente (Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif; Amersham; Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL; Grand Island, N.Y.). Extractos membranosos, tales como extractos de páncreas de perro que contienen membranas microsomales, también están disponibles y útiles para traducir proteínas secretoras. En estos sistemas, que pueden incluir ARNm como molde (traducción in vitro) o ADN como molde (combinación de transcripción y traducción in vitro), la síntesis in vitro está dirigida por los ribosomas. Se ha aplicado un esfuerzo considerable al desarrollo de sistemas de expresión de proteínas acelulares. Véase, por ejemplo, Kim, D.M. y J.R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 74:309-316 (2001); Kim, D.M. y J.R. Swartz, Biotechnology Letters, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M., y J.R Swartz, Biotechnology Progress, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M., y J.R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 66, 180-188, (1999); y Patnaik. R. y J.R. Swartz, Biotechniques 24, 862-868, (1998); la patente de EE.UU. n° 6.337.191; la publicación de la patente de EE.UU. n° 2002/0081660; el documento WO 00/55353; el documento WO 90/05785. Otro enfoque que se puede aplicar a la expresión de polipéptidos de aminoácidos no naturales incluye la técnica de fusión ARNm-péptido. Véase, por ejemplo, Roberts and J. Szostak, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 94:12297-12302 (1997); A. Frankel, y col., Chemistry & Biology 10:1043 1050 (2003). En este abordaje, un molde de ARNm unido a puomicina se traduce en el péptido en el ribosoma. Si se han modificado una o más moléculas de ARNt, también se pueden incorporar en el péptido aminoácidos no naturales. Una vez que se ha leído el último codón de ARNm, la puomicina captura el extremo C del péptido. Si en un ensayo in vitro se encuentra que el conjugado ARNm-péptido resultante tiene propiedades interesantes, se puede revelar su identidad con facilidad a partir de la secuencia de ARNm. De este modo, se puede realizar la detección selectiva de bibliotecas de polipéptidos de aminoácidos no naturales que comprenden uno o más aminoácidos no naturales para identificar polipéptidos que tiene propiedades deseadas. Más recientemente se han notificado traducciones en ribosomas in vitro con componentes purificados, que permiten la síntesis de péptidos sustituidos con aminoácidos no naturales. Véase, por ejemplo, Forster y col., Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 100:6353 (2003).

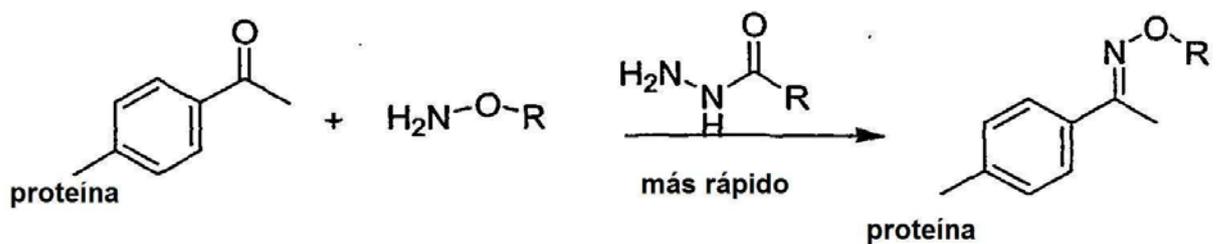
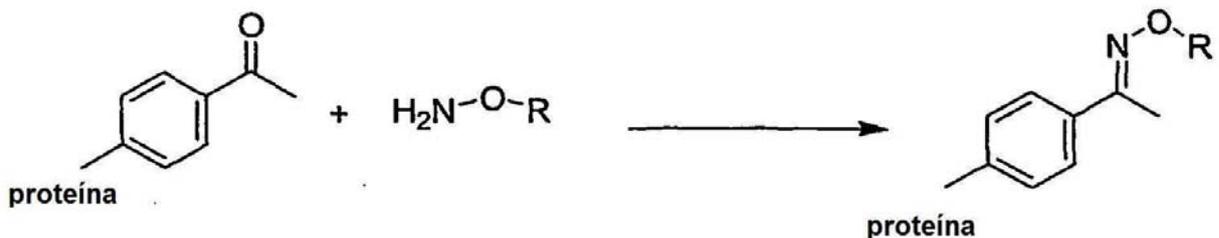
También se pueden usar sistemas de traducción reconstituidos. También se han usado con éxito mezclas de factores de traducción purificados para traducir ARNm en proteínas, así como combinaciones de lisados o lisados suplementados con factores de traducción purificados tales como el factor de iniciación 1 (IF-1), IF-2, IF-3 ( $\alpha$  o  $\beta$ ), factor de elongación T (EF-Tu) o factores de terminación. Los sistemas acelulares también pueden ser sistemas de transcripción/traducción acoplados en los que el ADN se introduce en el sistema, se transcribe en ARNm y el ARNm se traduce como se ha descrito en Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel y col. editors, Wiley Interscience, 1993).

El ARN transcrito en un sistema de transcripción eucariótica puede estar en forma de ARN heteronuclear (ARNhn) o topes en el extremo 5' (7-metilguanosina) y ARNm maduro con cola de poliA en 3', que puede ser una ventaja en ciertos sistemas de traducción. Por ejemplo, los ARNm sellados se traducen con una eficiencia elevada en el sistema de lisado de reticulocitos.

## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1: Mejor formación de oxima en presencia de acelerador**

En el Esquema 1<sup>a</sup> se muestra un compuesto que contiene carbonilo (polipéptido de aminoácidos no naturales). El grupo ceto del aminoácido para-acetilfenilalanina incorporado en la proteína reacciona con un compuesto que contiene hidroxilamina para formar una oxima relativamente estable. Esta reacción es altamente específica. Se observó una reacción más rápida en presencia de un acelerador (Esquema 1B).



### **Ejemplo 2: Detección selectiva de posibles aceleradores usando conjugación de hGH-PAcF 30 K**

Se usó la hormona de crecimiento humano (hGH) con para-acetilfenilalanina sustituida por tirosina en la posición 35 para realizar detección selectiva de un panel de 20 compuestos (FIG. 5). La hGH se intercambió en tampón en un tampón de reacción de hGH (NaOAc 20 mM, 20 mg/ml de glicina, 5 mg/ml de manitol, EDTA 1 mM, pH 4,0) usando una columna PD10 y se concentró hasta 10 mg/ml usando un concentrador Centrocon (10 k MWCO). La hGH (10 µl) se mezcló con 3,6 µl de monohidroxilamina 30 K PEG (2,5 Mm), 3 µl de potencial solución del acelerador (200 mM en tampón de reacción de hGH) y tampón para dar un volumen final de 30 µl. La proporción molar de hGH:PEG fue 1:2. Las mezclas de reacción se incubaron a 28°C durante 16 horas y 36 horas y se analizó mediante SDS-PAGE (FIG. 6). Cada calle de los geles que se muestran en la Figura 6 está marcada con el compuesto sometido a ensayo como se muestra en la Figura 5. La última calle de cada gel era una reacción control (sin acelerador). Los compuestos 6, 7, 8, 10 y 20 eran aceleradores. Dos compuestos del panel, los compuestos 7 y 29 (hidrazida acética) (imagen en la Figura 5) eran aceleradores y se evaluaron adicionalmente en condiciones de reacción similares con una concentración de la proteína hGH más alta (8 mg/ml). Las mezclas de reacción se incubaron a 28°C durante 16 horas y los resultados del análisis SDS-PAGE se muestran en la FIG. 7. La calle 1 era una mezcla de reacción con una proporción molar de hGH:PEG de 1:2 y 50 mM del compuesto acelerador 7. La calle 2 era una mezcla de reacción con una proporción molar de hGH:PEG de 1:2 y 50 mM del compuesto acelerador 20. La calle 3 era una mezcla de reacción con una proporción molar de hGH:PEG de 1:2 sin acelerador. La calle 4 era una mezcla de reacción con una proporción molar de hGH:PEG de 1:2 sin acelerador. Después de 16 horas, se mostró que ambos compuestos catalizaban la reacción.

### **Ejemplo 3: Análisis CLEM de hGH tras incubación con el acelerador**

En tampón de reacción de hGH, la hGH silvestre (5,8 mg/ml) se incubó con varias concentraciones del acelerador hidrazida acética (mezcla de 200 mM, 100 mM, 50 mM, 25 mM, 12,5 mM, 6,25 mM y 0 a 28 °C durante 48 horas. El acelerador se eliminó mediante diálisis (10 k MWCO). Las soluciones proteicas resultantes se analizaron mediante CLEM (FIG. 8).] La Figura 10A muestra el trazado total de la CLEM. La Figura 8B muestra el espectro de masas de la hGH sin acelerador. La Figura 8C muestra el espectro de masas con el acelerador hidrazida acética 200 mM.

Preferentemente, un acelerador para la conjugación de proteínas no ejerce ningún efecto de deterioro sobre las proteínas, tales como fragmentación, precipitación y modificación covalente no deseada. No se observó fragmentación alguna al usar los aceleradores 7 y 20 (mostrados en la Figura 5) en base al análisis SDS-PAGE y la precipitación de proteínas en todas las condiciones usadas con scFv y hGH. Por ejemplo, no se pudo detectar ninguna modificación covalente con CLEM tras 48 horas de incubación de hGH silvestre con hasta 200 mM del acelerador 20 (hidrazida acética). Los pesos moleculares medidos de hGH en todas las condiciones son iguales y coinciden con el valor teórico 22256.

### **Ejemplos 4: Dimerización de una etapa de scFv-pAcF**

Se usó la proteína 108 Fv de una cadena (scFv) con el para-acetilfenilalanina sustituida en la posición 259 (scFv 108 259-pAcF) en el siguiente experimento de conjugación scFv 108 259-pAcF en tampón de almacenamiento, se

intercambió en tampón con tampón de reacción (NaCl 150 mM, NaOAc 20 mM, EDTA 5 mM, pH 4,0) usando una columna PD10. La solución proteica se concentró hasta 0,5 mM, se mezcló con enlazador de hidroxilamina homobifuncional 2K PEG, solución madre 2,5 mM y se suplementó con hidrazida acética como acelerador. La mezcla de reacción fina consistió en enlazador homobifuncional 2K PEG 147  $\mu$ M, la concentración correspondiente de scFV sustituido con pAcF e hidrazida acética 47 mM. Las mezclas de reacción se incubaron a 28°C y se analizaron a diferentes puntos de tiempo (6 horas, 20 horas, 44 horas) mediante SDS-PAGE (FIG. 2).

Para hacer la reacción de una etapa más eficiente y más práctica con el enlazador homobifuncional 2K PEG, se usaron aceleradores para facilitar el proceso de dimerización. Sin acelerador se pudo detectar muy poco producto dimérico tras 20 horas mediante SDS-PAGE. La calle 4 de los geles de 6 horas, 20 horas y 44 horas muestran mezclas de reacción con una proporción molar entre scFV:PEG de 2,0:1 sin el acelerador hidrazida acética. Por otro lado, en presencia de hidrazida acética 47 mM, el producto dimérico apareció tras 6 horas. Como se muestra en la Figura 2, se analizaron diferentes proporciones molares entre la proteína y el enlazador 1,6:1, 2,0:1 y 2,4:1 para determinar las mejores condiciones de conjugación. La calle 1 de los geles de 6 horas, 20 horas y 44 horas muestran mezclas de reacción con una proporción molar entre scFV:PEG de 1,6:1 con hidrazida acética. La calle 2 de los geles de 6 horas, 20 horas y 44 horas muestran mezclas de reacción con una proporción molar entre scFV:enlazador de 2,0:1 con hidrazida acética. La calle 3 de los geles de 6 horas, 20 horas y 44 horas muestran mezclas de reacción con una proporción molar entre scFV:enlazador de 2,4:1 con hidrazida acética. Como control, el scFV 108 se incubó con hidrazida acética 47 mM en ausencia del enlazador homobifuncional PEG durante 44 horas. No se observó formación de dímero. La calle 5 de los geles de 6 horas, 20 horas y 44 horas muestra mezclas de scFv y acelerador hidrazida acética sin el enlazador PEG. Este resultado indica que el acelerador, la hidrazida acética, no facilita la formación de puentes disulfuro intermoleculares entre scFv. En presencia del enlazador homobifuncional PEG, el dímero se produce a través de la formación de oxima entre el enlazador PEG y la proteína.

#### **Ejemplo 5: Conjugación de monohidroxilamina 30 K PEG y scFv-pAcF**

La solución madre de scFv 108 259-pAcF 0,5 mM en el tampón de reacción mencionado con anterioridad (10  $\mu$ l) se mezcla con varias cantidades de la solución madre de monohidroxilamina 30 K PEG 2,5 mM, 2,2  $\mu$ l de solución madre de hidrazida acética 200 mM y tampón de reacción. Las mezclas de reacción con un volumen de reacción final de 22  $\mu$ l tienen diferentes proporciones molares de scFv:PEG (1:3 o 1:5). El efecto acelerador de la hidrazida acética tras la conjugación de monohidroxilamina 30 K PEG y scFv se evaluó a una proporción molar entre la proteína y PEG de 1:3 y 1:5 con y sin acelerador. Las mezclas de reacción se incubaron a 28°C y se analizaron a diferentes puntos de tiempo (20 horas, 44 horas) mediante SDS-PAGE (FIG. 3). Las calles 1, 2 y 3 muestran 100%, 20% y 10% del scFv-pAcF de partida, respectivamente. La calle 4 de los geles de 20 horas y 44 horas muestran mezclas de reacción con una proporción molar entre scFv:PEG de 1:3 con hidrazida acética 20 mM. La calle 5 de los geles de 20 horas y 44 horas muestran mezclas de reacción con una proporción molar entre scFv:PEG de 1:3 sin acelerador. La calle 6 de los geles de 20 horas y 44 horas muestran mezclas de reacción con una proporción molar entre scFv:PEG de 1:5 con hidrazida acética 20 mM. La calle 7 de los geles de 20 horas y 44 horas muestran mezclas de reacción con una proporción molar entre scFv:PEG de 1:5 sin acelerador. Los resultados de conjugación demostraron que la hidrazida acética acelera la reacción de conjugación. La reacción a una proporción molar de 1:3 de proteína:PEG con acelerador progresó más rápido que la reacción a una proporción de 1:5 de proteína:PEG sin acelerador.

De forma similar, se evaluó la eficiencia de la conjugación relativa de diferentes concentraciones del acelerador hidrazida acética (5 mM, 20 mM, 80 mM) con una proporción molar de scFv:30 K PEG monohidroxilamina de 1:2 (FIG. 4). Las mezclas de reacción se incubaron a 28°C. La calle 1 muestra la mezcla de reacción con hidrazida acética 5 mM (proporción molar ScFv:30 K PEG monohidroxilamina de 1:2). La calle 2 muestra la mezcla de reacción con hidrazida acética 20 mM (proporción molar ScFv:30 K PEG monohidroxilamina de 1:2). La calle 3 muestra la mezcla de reacción con hidrazida acética 80 mM (proporción molar ScFv:30 K PEG monohidroxilamina de 1:2). La calle 4 muestra la mezcla de reacción sin hidrazida acética (proporción molar ScFv:30 K PEG monohidroxilamina de 1:5). Las calles 5, 6 y 7 muestran 10%, 20% y 100% del scFv-pAcF de partida, respectivamente. El análisis SDS-PAGE mostró que cuanto mayor es la concentración del acelerador, más rápida es la conjugación. La conjugación a una proporción molar ScFv:PEG de 1:2 en presencia del acelerador 80 mM es más rápida que la conjugación a una proporción molar ScFv:PEG de 1:5 sin el acelerador.

#### **Ejemplo 6: Estudios con moléculas pequeñas de la formación de oxima acelerada**

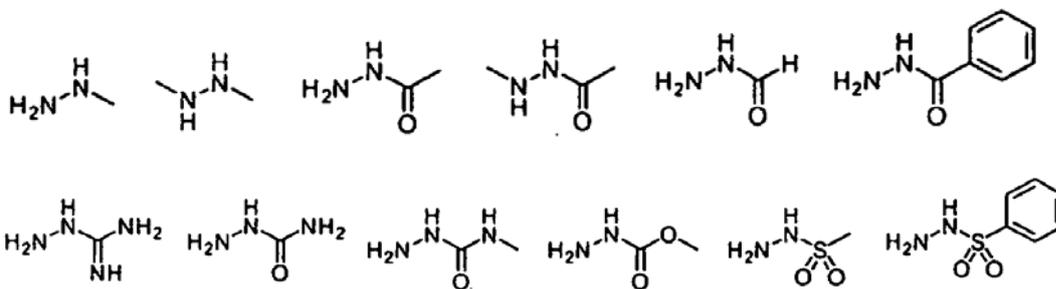
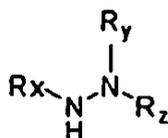
Se hizo reaccionar acetofenona (0,5 mM) con etilhidroxilamina (1 mM) en solución acuosa tamponada hasta un pH de aproximadamente 4,0; a esta mezcla de reacción se añadió una serie de aceleradores (20 mM) para determinar el efecto de la identidad del acelerador sobre la velocidad y el rendimiento de la formación de oxima (véase la FIG. 10(a)). Los aceleradores sometidos a ensayo en este modelo de reacción se presentan en la FIG. 10(b). Se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción y se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento tras 2 horas, 5 horas, 9 horas y 24 horas. Además, para cada una de estas muestras, se comparó la absorbancia del pico de acetofenona con la absorbancia del pico de oxima a 260 nm usando espectroscopia UV/vis. La FIG. 11 presenta los resultados tras 2 horas y 9 horas de reacción. Como se puede ver, todos los aceleradores incrementan la velocidad de formación de

oxima; no obstante, los aceleradores 1 y 7 (que se muestran en la Figura 10(b)) proporcionan el rendimiento más alto, proporcionando el acelerador 2 el mayor rendimiento tras tiempos de reacción más prolongados. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la actividad del acelerador parece depender de la velocidad de la reacción con la cetona y de la estabilidad de la hidrazona intermedia.

5

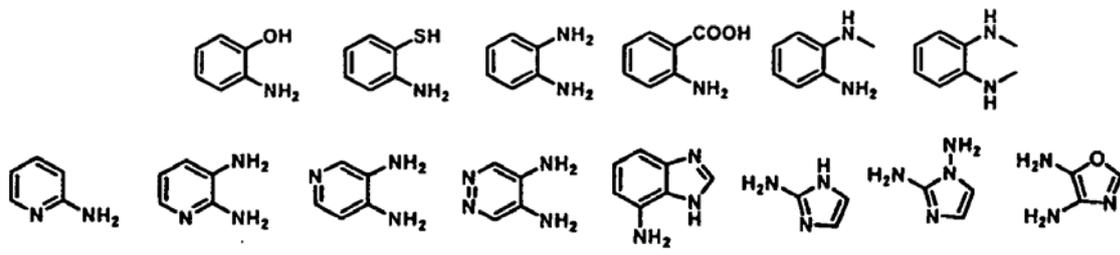
REIVINDICACIONES

1.- Una mezcla de reacción que comprende un compuesto que comprende un resto de cetona aromática, un compuesto que comprende un resto de hidroxilamina y un acelerador seleccionado del grupo que consiste en aminas aromáticas bifuncionales, derivados de oxoamina y compuestos que tienen las estructuras siguientes:



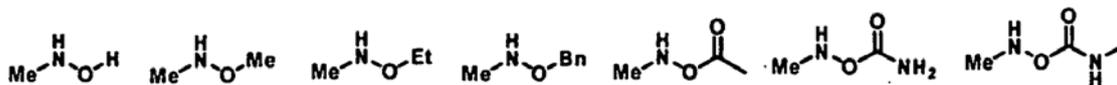
en las que  $R_x$ ,  $R_y$  y  $R_z$  se seleccionan del grupo que consiste en  $L_x$ -H,  $L_x$ -alquilo,  $L_x$ -arilo,  $L_x$ -heteroarilo,  $L_x$ -alquenilo,  $L_x$ -alquinilo,  $L_x$ -alcoxi y  $L_x$ -alquilamina, en los que  $L_x$  es un enlace, C(=O), C(=NH), C(=NH)-NH, SO y SO<sub>2</sub>; y en las que la amina aromática bifuncional se selecciona del grupo que consiste en:

**Aminas aromáticas bifuncionales:**



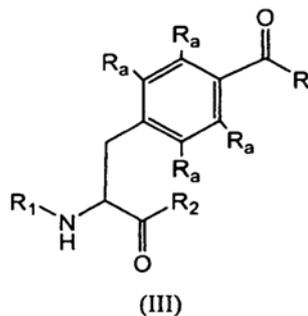
y en las que la oxoamina se selecciona del grupo que consiste en:

**Derivados de oxoamina:**



2.- La mezcla de reacción de la reivindicación 1, en la que el compuesto que comprende un resto de cetona aromática es un aminoácido o un polipéptido.

3.- La mezcla de reacción de la reivindicación 1, en la que el compuesto que comprende un resto de cetona aromática tiene la estructura:



en el que:

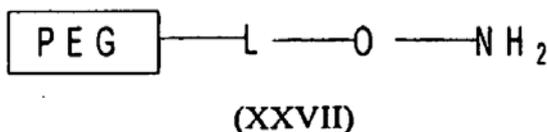
R es alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

- 5 R<sub>2</sub> es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido, en el que cada R<sub>a</sub> esta seleccionado, de forma independiente, del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' en los que k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' y -S(O)<sub>k</sub>R',

4.- La mezcla de reacción de la reivindicación 1, en la que el compuesto que comprende un resto de hidroxilamina comprende además un resto polimérico:

- 10 5.- La mezcla de reacción de la reivindicación 1, en la que el compuesto que comprende un resto de hidroxilamina tiene la estructura:



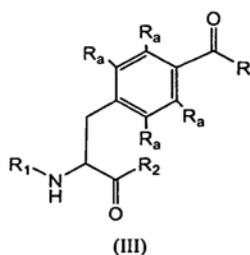
en el que:

- 15 cada L es un enlazador seleccionado de forma independiente del grupo que consiste en alquileno, alquileno sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido), -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- en el que k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -(alquileno o alquileno sustituido)NR'C(O)O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -O-CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(O)O-(alquileno o alquileno sustituido), -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')<sub>2</sub>-N=N-, y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido.

- 25 6.- La mezcla de reacción de la reivindicación 1, en la que el acelerador es una amina aromática bifuncional.

7. La mezcla de reacción de la reivindicación 1, en la que el acelerador es un derivado de oxoamina.

8. Un procedimiento para obtener mediante derivación un aminoácido de Fórmula (III), comprendiendo el procedimiento poner en contacto el aminoácido con un reactivo de Fórmula (XXVII) en presencia de un acelerador, en el que la Fórmula (III) corresponde a:



en el que:

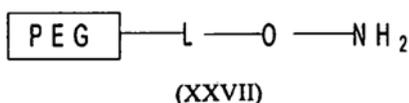
R es alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

5 en la que cada R<sub>a</sub> se selecciona, de forma independiente, del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' en los que k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' y -S(O)<sub>k</sub>R',

en la que la Fórmula (XXVII) corresponde a:



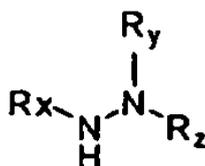
10

en la que:

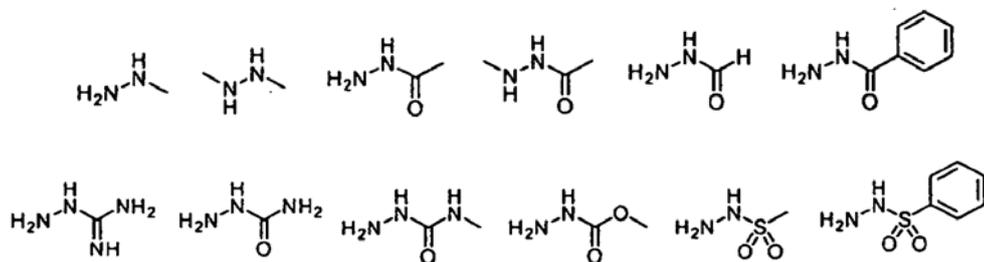
15 cada L es un enlazador seleccionado de forma independiente del grupo que consiste en alquileno, alquileno sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido), -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido), -S(O)<sub>k</sub>- en el que k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -(alquileno o alquileno sustituido)NR'C(O)O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -OCON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(O)O-(alquileno o alquileno sustituido), -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')=N-, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido; y

20

en el que el acelerador está seleccionado del grupo que consiste en aminas aromáticas bifuncionales, derivados de oxoamina y compuestos que tienen las estructuras siguientes:



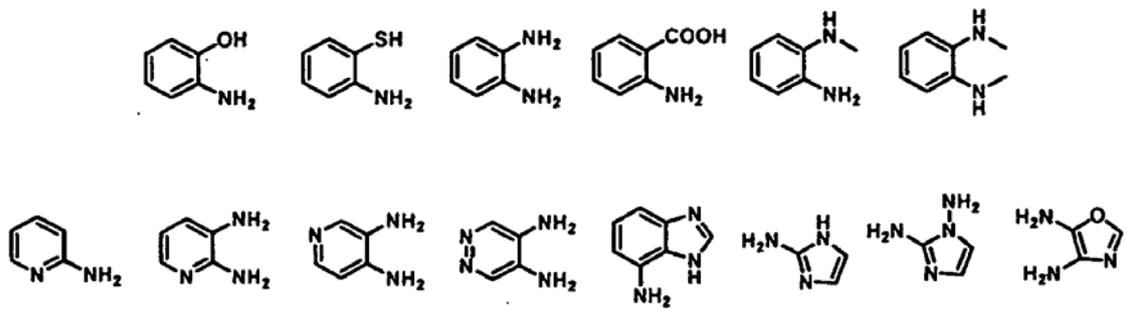
25



en las que R<sub>x</sub>, R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> están seleccionados del grupo que consiste en: L<sub>x</sub>-H, L<sub>x</sub>-alquilo, L<sub>x</sub>-arilo, L<sub>x</sub>-heteroarilo, L<sub>x</sub>-alquenilo, L<sub>x</sub>-alquinilo, L<sub>x</sub>-alcoxi y L<sub>x</sub>-alquilamina, en los que L<sub>x</sub> es un enlace, C(=O), C(=NH), C(=NH)-NH y SO, SO<sub>2</sub>.

30 y en el que la amina aromática bifuncional está seleccionado del grupo que consiste en:

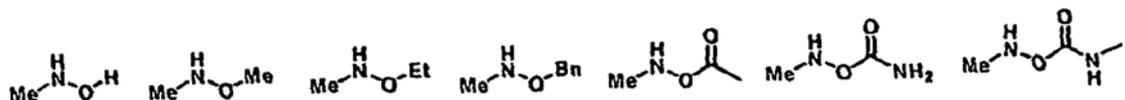
## Aminas aromáticas bifuncionales:



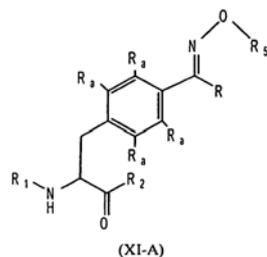
5

y en las que la oxoamina está seleccionada del grupo que consiste en:

## Derivados de oxoamina:



- 9.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que R es alquilo.
- 10 10.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que R es CH<sub>3</sub>.
- 11.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el acelerador tiene la estructura: H<sub>2</sub>N-NH-C(O)-R<sub>b</sub>, en la que R<sub>b</sub> es alquilo, alquilo sustituido, NH-NH<sup>2</sup>, H y alcoxi.
- 12.- El procedimiento de la reivindicación 11, en el que R<sub>b</sub> es alquilo o alcoxi.
- 13.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el acelerador está seleccionado del grupo que consiste en los compuestos identificados como 6, 7, 8, 10 y 20 de la Figura 5.
- 15 14.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el acelerador es una amina aromática bifuncional.
- 15.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el acelerador es un derivado de oxoamina.
- 16.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el peso molecular del grupo PEG está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.
- 20 17.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el aminoácido se pone en contacto con el reactivo de Fórmula (XXVII) en solución acuosa a aproximadamente la temperatura ambiente.
- 18.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el aminoácido se pone en contacto con el reactivo de Fórmula (XXVII) en solución acuosa a un pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10.
- 25 19.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la proporción molar del aminoácido y el reactivo de Fórmula (XXVII) está seleccionado del grupo de aproximadamente 1:2; 1:1; 1,5:1; 1,5:2; 2:1; 1:1,5; 2:1,5 y 1,5 a 2.
- 20.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que aminoácido de Fórmula (III) ha sido incorporado de forma específica de sitio durante la traducción *in vivo* de un polipéptido.
- 21.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que aminoácido derivado comprende al menos un aminoácido que contiene oxima que tiene la estructura de Fórmula (XI-A):



en la que:

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

5 R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R<sub>2</sub> es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

en la que cada R<sub>a</sub> está seleccionada, de forma independiente, del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' en los que k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' y -S(O)<sub>k</sub>R',

R<sub>5</sub> es L-X, en el que

X es un PEG; y

10 L es opcional y, cuando está presente, es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno, alquileno sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido), -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido), -S(O)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es, de forma independiente, H, alquilo o alquilo sustituido.

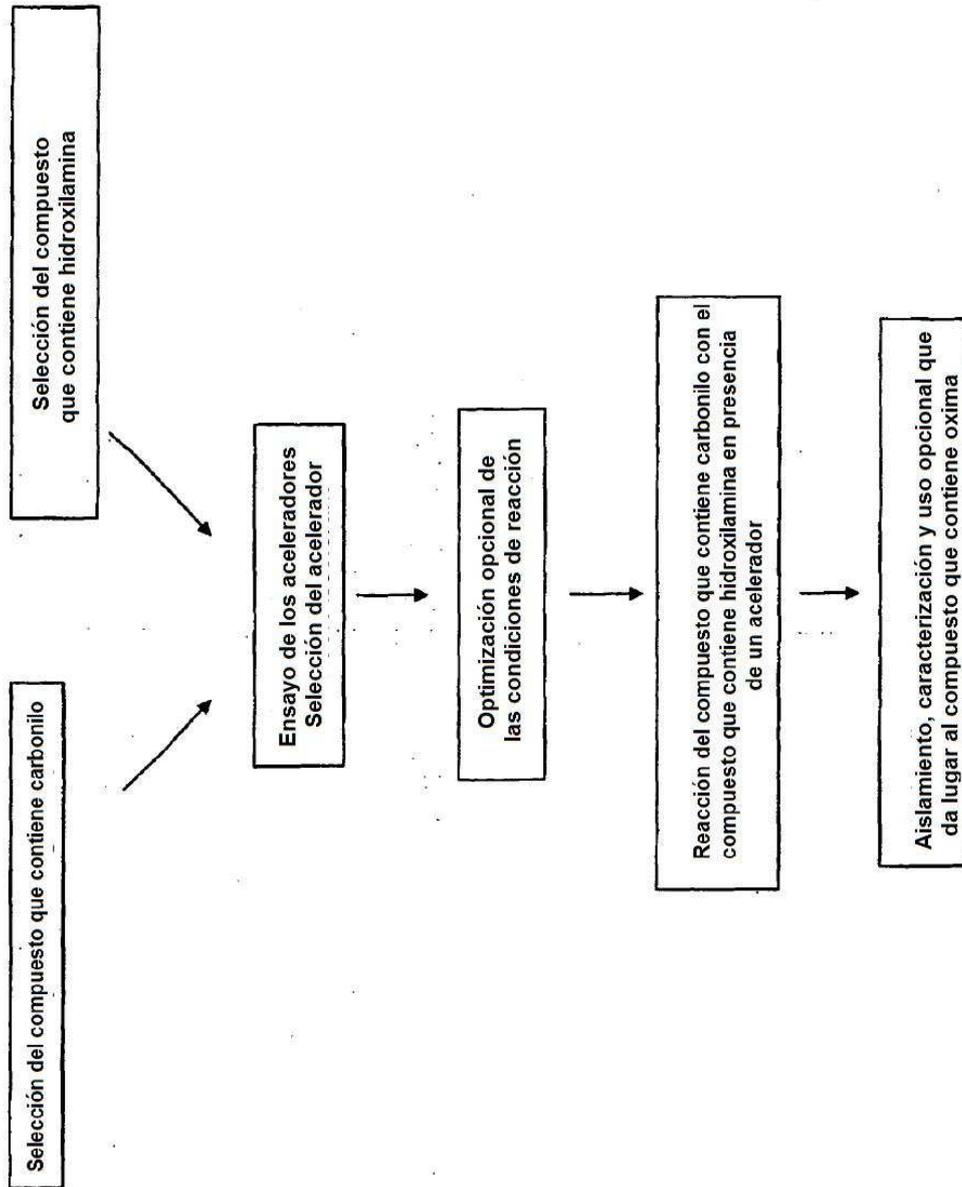


Figura 1

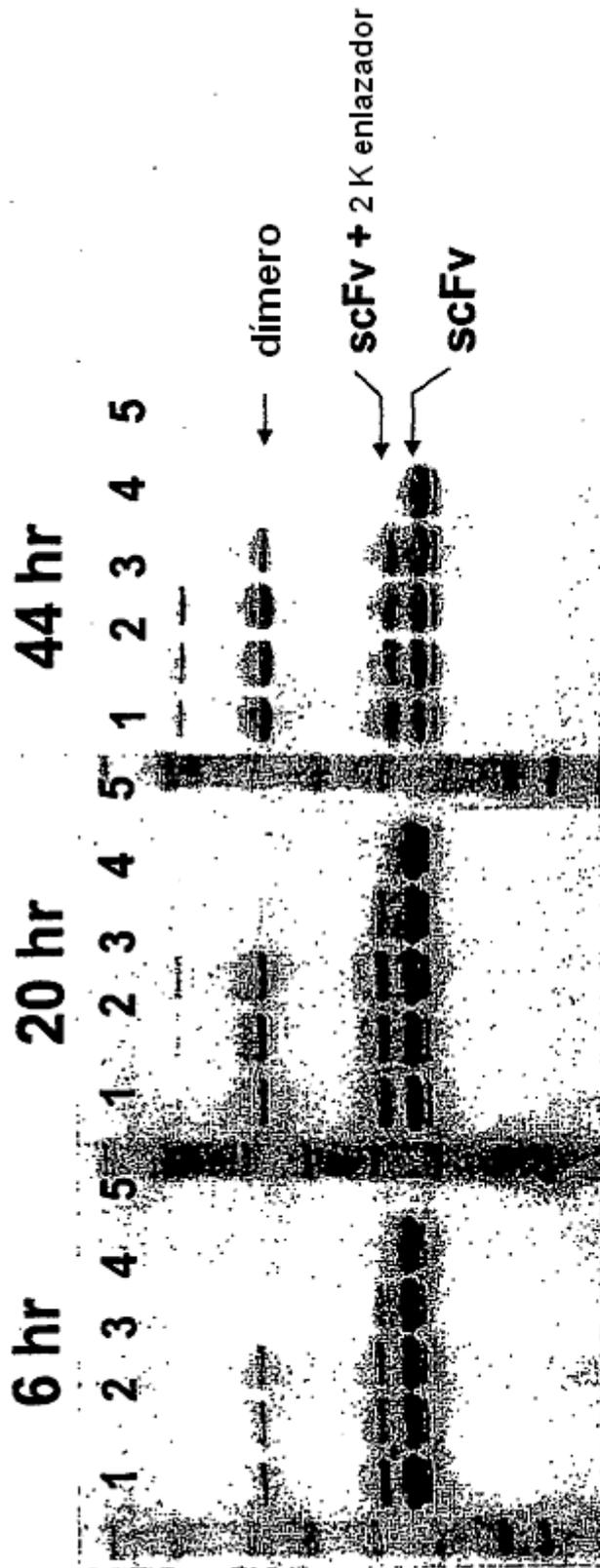


Figura 2

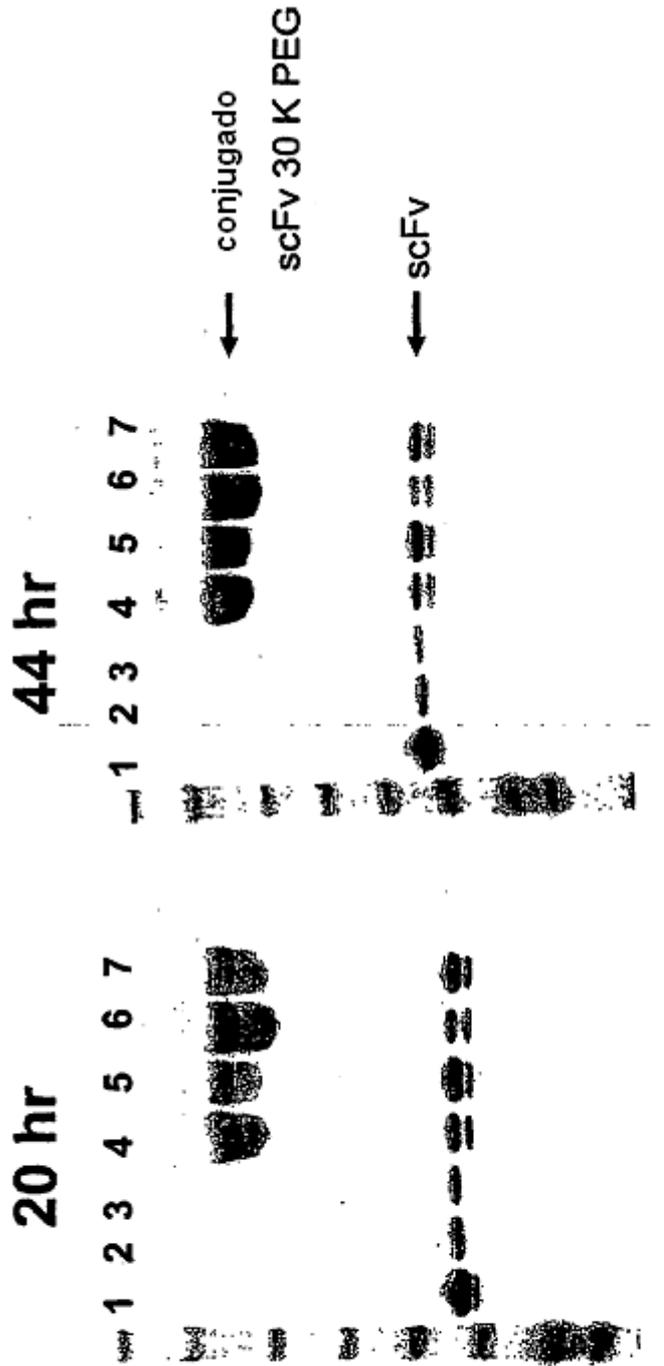


Figura 3



Figura 4

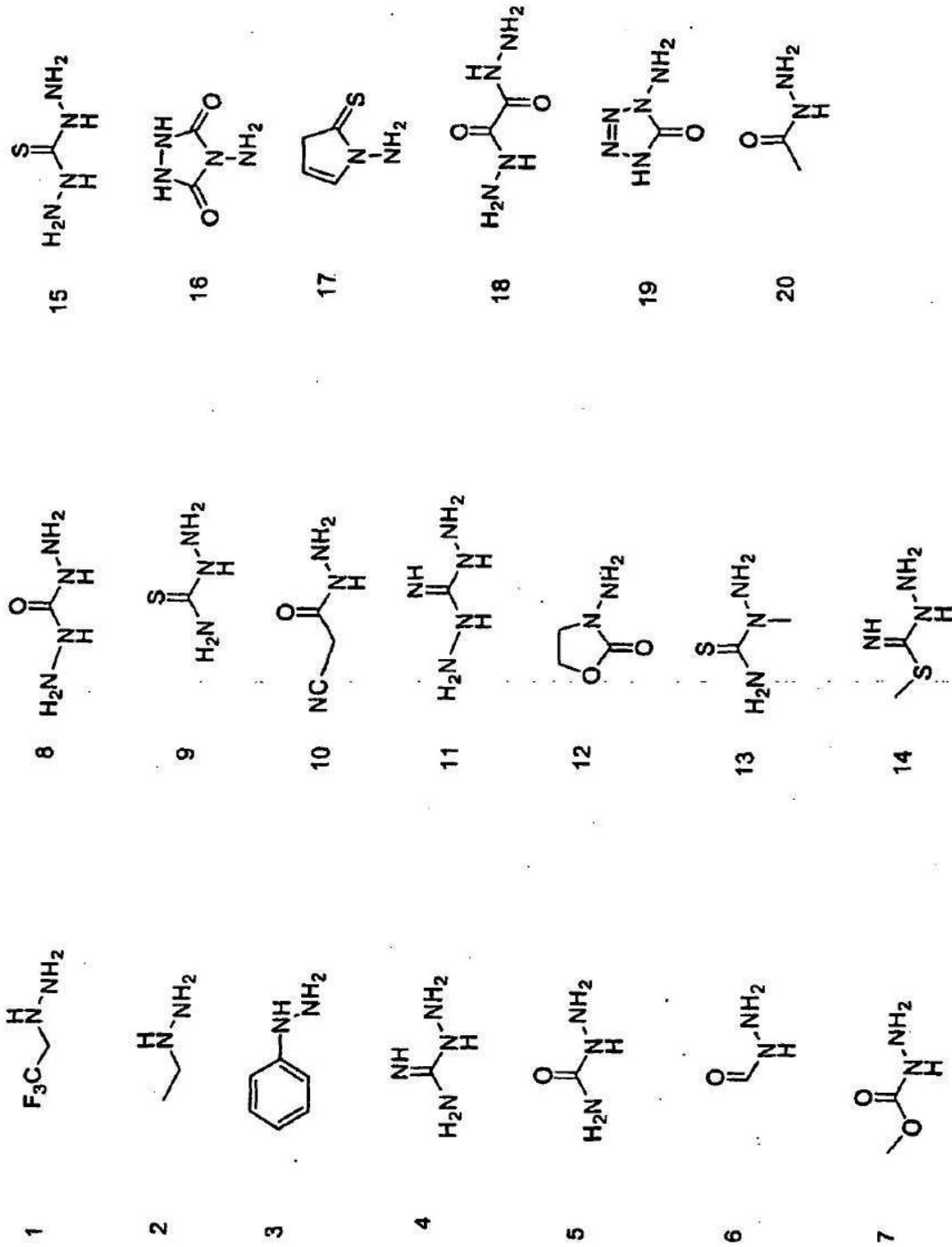


Figura 5

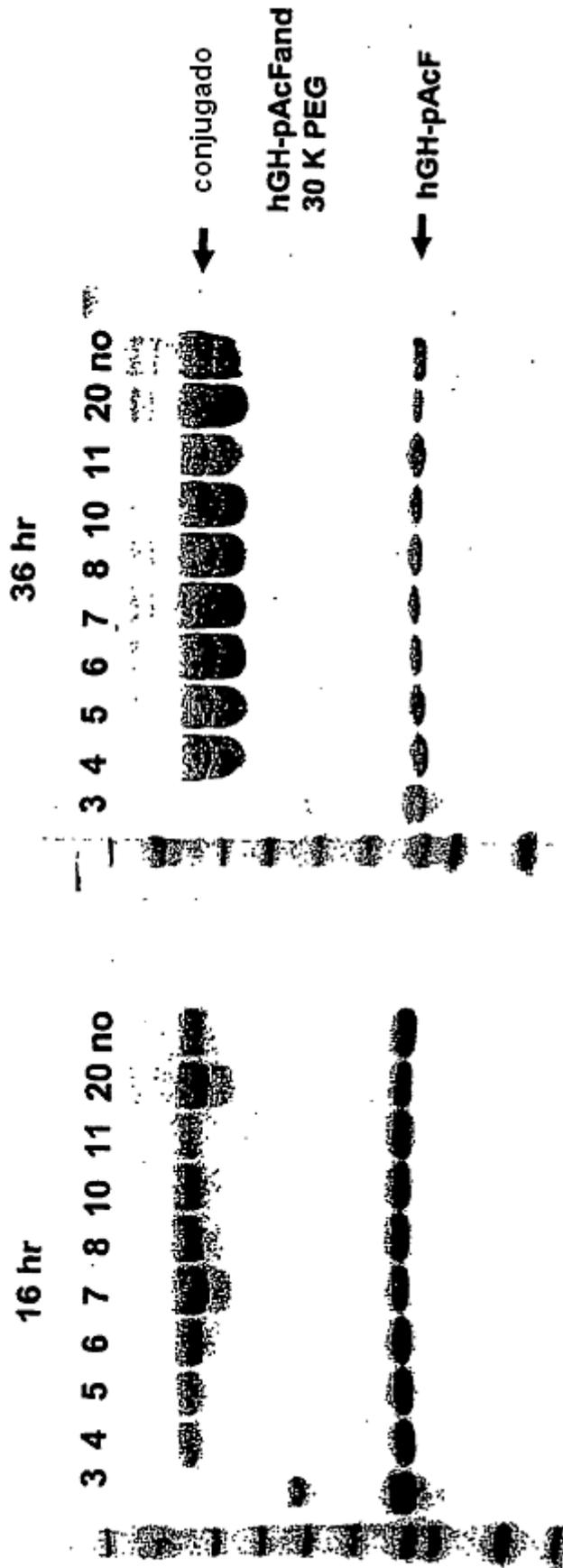


Figura 6



Figura 7

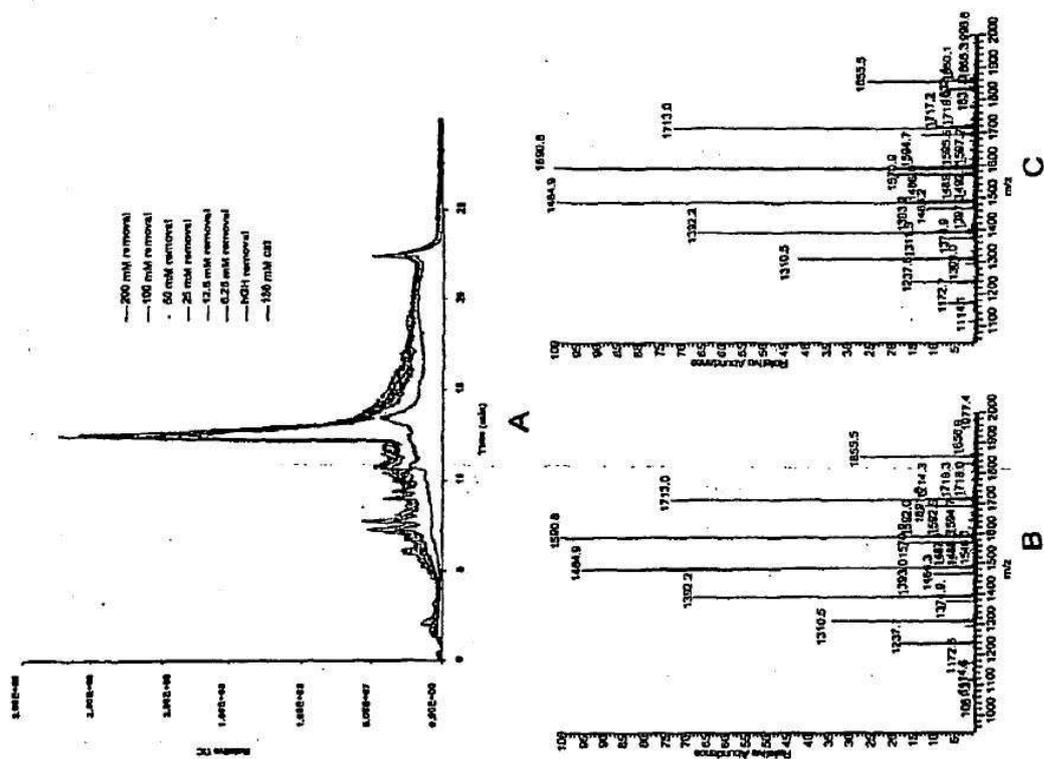
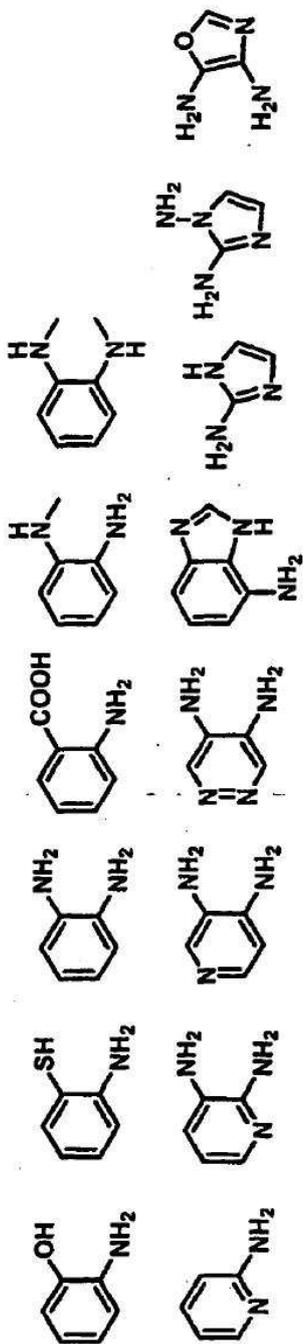


Figure 8

Aminas aromáticas bifuncionales



Derivados de oxoamina:



Derivados de hidrazina:

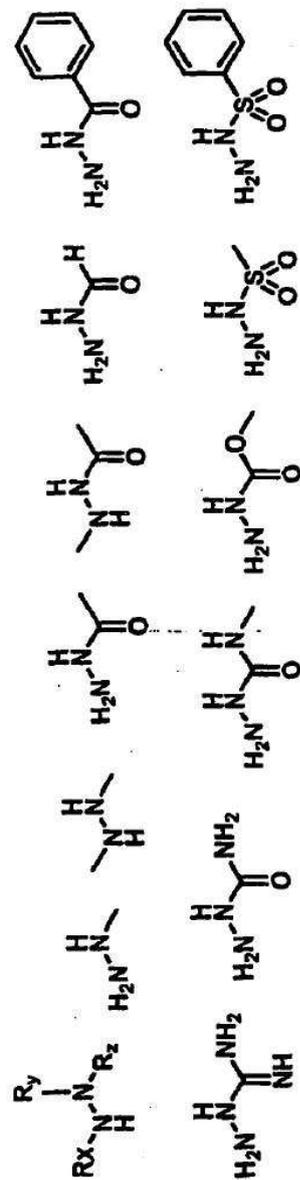


Figura 9

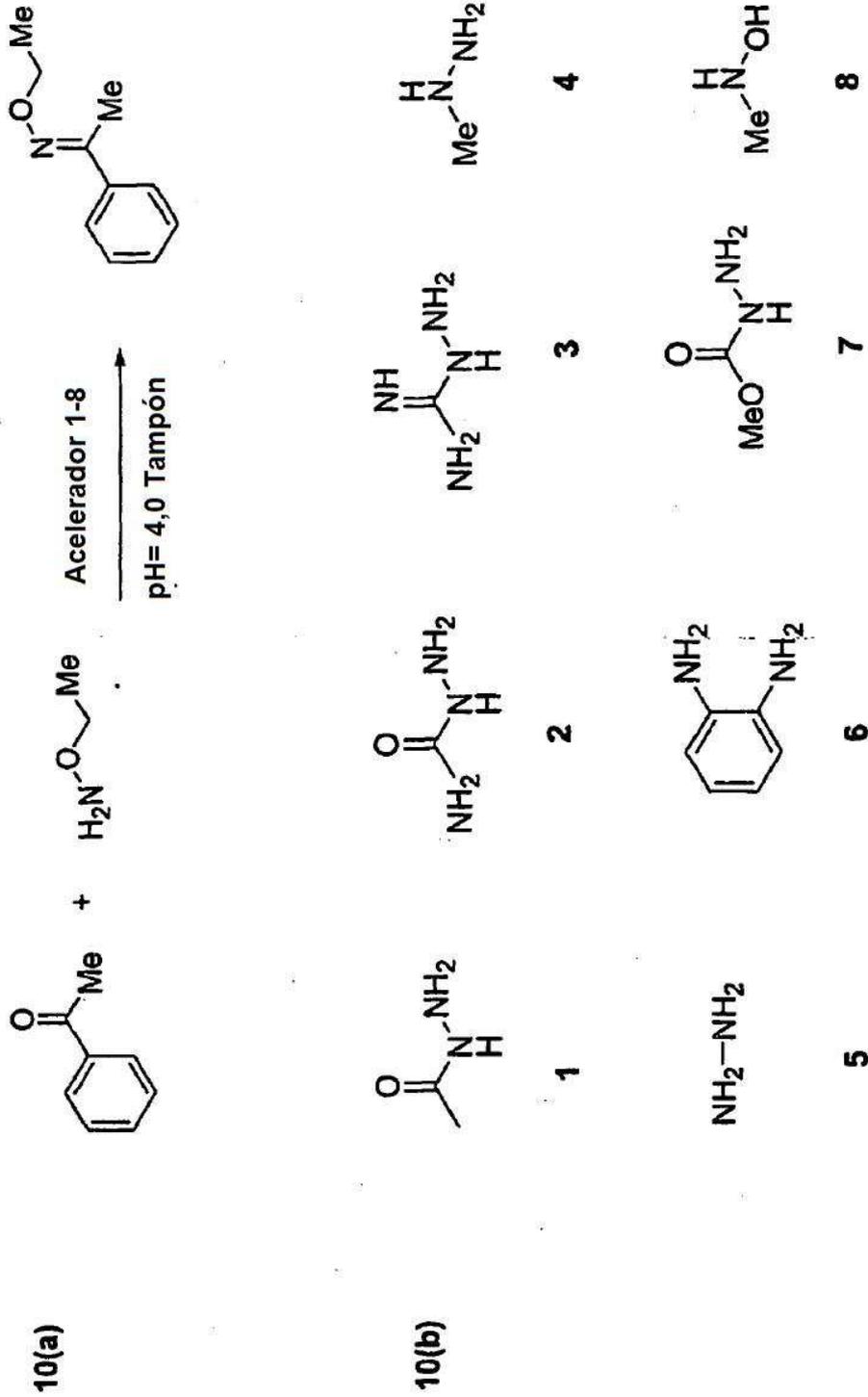
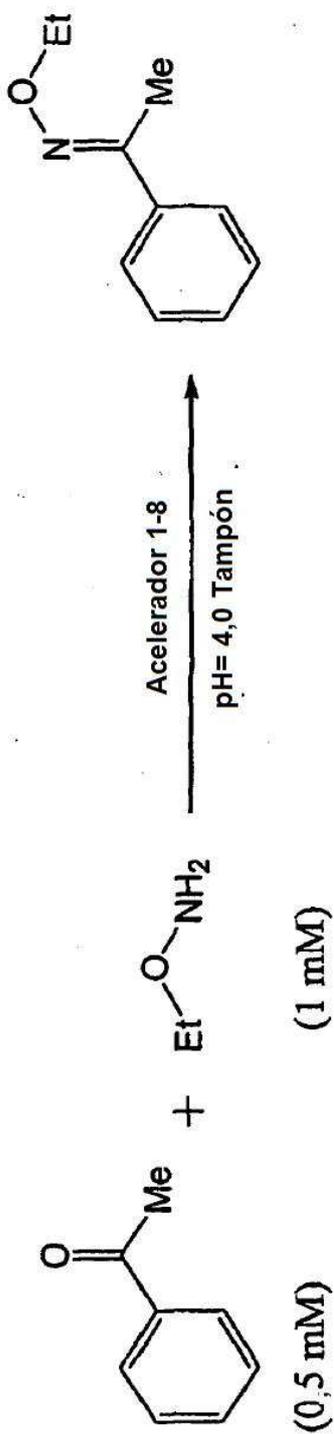


Figura 10



Tiempo	Rendimiento oxima (%) <sup>*</sup> usando los aceleradores 1-8 (20 mM)								
	Ninguno	1	2	3	4	5	6	7	8
2h	17	36	32	30	30	32	32	39	30
9h	51	79	67	59	58	68	58	72	59

<sup>\*</sup>valores calculados mediante HPLC usando un pico patrón de oxima

Figura 11