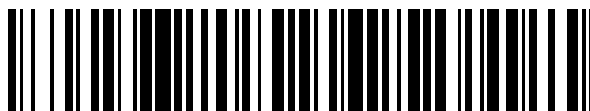


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 554**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/06** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2006** **E 10191428 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015** **EP 2339014**

54 Título: **Métodos y composiciones que comprenden aminoácidos no naturales**

30 Prioridad:

**16.11.2005 US 737855 P**

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

**07.10.2015**

73 Titular/es:

**AMBRX, INC. (100.0%)**  
**10975 North Torrey Pines Road, Suite 100**  
**La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**MIAO, ZHENWEI;**  
**TIAN, FENG;**  
**HAYS PUTNAM, ANNA-MARIA A. y**  
**BUECHLER, YING**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 547 554 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).

**Métodos y composiciones que comprenden aminoácidos no naturales****Descripción****5 ANTECEDENTES DEL INVENTO**

10 **[0001]** La capacidad para incorporar aminoácidos sin codificación genética (es decir, "aminoácidos no naturales") a proteínas hace posible la introducción de grupos funcionales químicos que pueden suministrar alternativas valiosas a los grupos funcionales que ocurren naturalmente, tales como la épsilon-NH<sub>2</sub> de lisina, el sulfidrihilo -SH de cisteína, el grupo imino de histidina, etcétera. Ciertos grupos funcionales químicos son conocidos por ser inertes a los grupos funcionales encontrados en los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente pero reaccionan en una forma ineficiente de para formar vínculos estables con grupos funcionales que pueden ser incorporados a los aminoácidos no naturales.

15 **[0002]** Existen métodos disponibles para inducir selectivamente grupos funcionales químicos que no se cuentan en proteínas, que son químicamente inertes at todos los grupos funcionales encontrados en los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente y que pueden ser utilizados para reaccionar en forma eficiente y selectiva con ciertos grupos funcionales para formar enlaces covalentes estables.

**20 RESUMEN DEL INVENTO**

25 **[0003]** Aquí se describen métodos, composiciones, técnicas y estrategias para hacer, purificar, detectar, caracterizar y usar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y poli péptidos de aminoácidos no naturales modificados.

30 **[0004]** Este invento suministra una composición que contiene un polipéptido enlazado covalentemente de una molécula de ácido nucleico a una o más posiciones específicas de aminoácidos de aquel polipéptido, donde aquella molécula de ácido nucleico está enlazada en una forma covalente a una cadena lateral de aminoácidos de un aminoácido codificado no naturalmente de aquel polipéptido.

35 **[0005]** Aquí se presenta un método para detectar un polipéptido que involucra el detectar una cadena lateral de aminoácidos codificada no naturalmente del polipéptido. En algunas instancias, el polipéptido es sintetizado ribosómicamente. También se presenta métodos para detectar un polipéptido los cuales involucran el detectar una cadena lateral de aminoácidos codificada no naturalmente en el polipéptido que ha sido modificado después de su traducción. También se presentan métodos para detectar una cadena de aminoácidos codificada no naturalmente en aquel polipéptido que involucra el contactar a la cadena lateral de aminoácidos codificada no naturalmente de una molécula que contiene un grupo funcional que interactúa específicamente con la cadena lateral de aminoácidos codificada no naturalmente. También se presentan métodos para purificar un polipéptido que tiene un aminoácido codificado no naturalmente de en la cadena del polipéptido. En algunas instancias, el método involucra el contactar el polipéptido con una sustancia que interactúa con la cadena lateral de aminoácidos codificada no naturalmente en el polipéptido. En otras instancias, se presenta un método para purificar un polipéptido que tiene un aminoácido codificado no naturalmente en la cadena del polipéptido que involucra la precipitación del polipéptido, donde el aminoácido codificado no naturalmente altera la solubilidad del polipéptido cuando se compara a la solubilidad del polipéptido sin un aminoácido codificado no naturalmente en la cadena del polipéptido. Los métodos para purificar un polipéptido hecho en forma ribosómica que tiene un aminoácido codificado no naturalmente en la cadena lateral del polipéptido involucra la electroforesis del polipéptido, donde el aminoácido codificado no naturalmente altera la movilidad electroforética del polipéptido cuando se lo compara con la movilidad electroforética del polipéptido sin un aminoácido codificado no naturalmente en la cadena del polipéptido. En otras instancias, el método para purificar un polipéptido hecho en forma ribosómica que tiene un aminoácido codificado no naturalmente de en la cadena lateral del polipéptido, incluye la diálisis del polipéptido, donde el aminoácido codificado no naturalmente altera la tasa de difusión del polipéptido cuando se compara a la tasa de difusión del polipéptido sin un aminoácido codificado no naturalmente en la cadena del polipéptido.

55 **[0006]** También se presenta en este documento lo un método para examinar una biblioteca de moléculas, incluyendo: a) el combinar un polipéptido que contiene un aminoácido codificado no naturalmente con las moléculas de la biblioteca bajo condiciones que permitan la interacción de las moléculas de la biblioteca con el polipéptido que contiene un aminoácido codificado no naturalmente, y b) identificar las moléculas de la biblioteca que interactúan con el polipéptido que contiene un aminoácido codificado no naturalmente. En algunas instancias, se examina una biblioteca de polipéptidos hechos en forma ribosómica que incluyen varios polipéptidos que tienen diferentes secuencias de aminoácidos, donde cada polipéptido incluye un aminoácido no natural.

60 **[0007]** También se presenta en este documento un método, que incluye: a) el sustituir un aminoácido codificado no naturalmente por un aminoácido codificado naturalmente en un sitio único preseleccionado en un polipéptido preseleccionado que tiene por lo menos una actividad biológica conocida; y b) el medir una actividad biológica del polipéptido preseleccionado que tiene al aminoácido codificado no naturalmente; y c) el comparar la actividad

65

biológica del polipéptido preseleccionado del paso b) con el polipéptido preseleccionado que tiene un aminoácido codificado no naturalmente sustituido por un aminoácido codificado naturalmente en una posición diferente en la cadena del polipéptido preseleccionado o con el polipéptido preseleccionado sin un aminoácido codificado no naturalmente sustituido en la cadena del polipéptido. En algunas ocasiones, un método para seleccionar una posición para una modificación después de la traducción de un polipéptido preseleccionado incluye a) el sustituir un aminoácido codificado no naturalmente por un aminoácido codificado naturalmente en un lugar preseleccionado en un polipéptido preseleccionado que tiene por lo menos una actividad biológica conocida; y b) el medir una actividad biológica del polipéptido preseleccionado que tiene el aminoácido codificado no naturalmente; y c) el comparar la actividad biológica del polipéptido preseleccionado del paso b) con el polipéptido preseleccionado que tiene un aminoácido codificado no naturalmente de sustituido por un aminoácido codificado naturalmente en una posición diferente de en la cadena del polipéptido preseleccionado o con el polipéptido preseleccionado sin un aminoácido codificado no naturalmente incluido en la cadena del polipéptido.

**[0008]** También se entiende que los métodos y composiciones aquí descritas no se limitan a la metodología, los protocolos, las líneas celulares, las estructuras y reactivos específicos aquí descritos y por tanto pueden variar también. Se tiende que la terminología aquí usada es para propósitos de describir únicamente secciones específicas, y no tiene la intención de limitar el alcance de los métodos y composiciones aquí descritas, lo cual será limitado únicamente por las declaraciones adjuntas.

## DEFINICIONES

**[0009]** Tal como se utiliza aquí y en las declaraciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el” / “la” incluirán referencias en plural a menos que el con texto lo indique claramente de otra forma.

**[0010]** A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado que es entendido comúnmente para una persona con conocimiento formal en la industria a la cual pertenecen los inventos aquí descritos. Aunque cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a aquellos aquí descritos puede ser utilizado en la práctica o para pruebas de los inventos aquí descritos, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen ahora.

**[0011]** Todas las publicaciones y patentes aquí mencionadas son para propósitos de describir y presentar, por ejemplo, las estructuras y metodologías que se describen en las publicaciones, que podrían ser utilizadas en conexión con los inventos aquí descritos. Las publicaciones aquí descritas son suministradas solamente de para su información previa a la fecha de presentación de esta aplicación. Nada en este documento debe ser considerado como una admisión de que los inventores aquí mencionados tienen el derecho a pre - fechar aquella presentación por virtud de un invento previo o por cualquier otra razón

**[0012]** Los términos “alcoxi”, “alquilamino” y “alquiltio” (o tioalcoxi) son utilizados en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo adheridos al resto de la molécula por medio de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de sulfuro, respectivamente.

**[0013]** El término “alquilo”, por sí solo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se declare de otra forma, una cadena lineal o ramificada, o un radical de hidrocarbano cíclico, o su combinación, que podría estar saturada completamente, mono o polisaturada y puede incluir radicales di- y multivalente, que tienen el número de átomos de carbón designados (es decir, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> significa de 1 a 10 carbonos). Ejemplos de radicales de hidrocarbano saturados incluyen, pero no se limitan a, 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 no saturados incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2- (butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3- (1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos superiores e isómeros. El término “alquilo”, a menos que se mencione de otra forma, también tiene el propósito de incluir aquellos derivados del alquilo definidos en más detalle a continuación, tales como “heteroalquilo”. Los grupos alquilo que están limitados a grupos de hidrocarbonos tienen el término de “homoalquilo”.

**[0014]** El término “alquilenos” por sí solo o como parte de otros sustituyente significa un radical divalente derivado de algún alcano, tal como se ejemplifica, pero no se limita, por las estructuras -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- and -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, e incluye además a aquellos grupos descritos a continuación, “heteroalquilenos”. Comúnmente, un grupo alquilo (o alquilenos) tendrá desde uno a 24 átomos carbonos, con aquellos grupos conteniendo 10 o menos átomos carbonos como una estructura particular de los métodos y composiciones aquí descritas. Un “alquilo más bajo” o “alquilenos más bajo” es un grupo alquilo o alquilenos con cadenas más cortas, generalmente teniendo ocho o menos átomos carbonos.

**[0015]** El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos que ocurren naturalmente y no naturalmente, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan en una forma similar a los aminoácidos que ocurren naturalmente. Aminoácidos codificados naturalmente son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina,

5 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 los compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que ocurre naturalmente, es decir, un carbono  $\alpha$  que está enlazado a hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, tal como, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, sulfonio de metil metionina. Aquellos análogos tienen grupos R modificados (tales como, la norleucina) o esqueletos de péptidos modificados, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido que ocurre naturalmente.

10 **[0016]** Los aminoácidos pueden ser referidos, en este documento, con sus símbolos de tres letras conocidos comúnmente o con los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission (Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB). Asimismo, los nucleótidos pueden ser referidos con sus códigos de letras individuales aceptados comúnmente.

15 **[0017]** Un “grupo de modificación terminal amino” se refiere a cualquier molécula que puede estar adherida al terminal amino de un polipéptido. Similarmente, un “grupo de modificación terminal carboxi” se refiere a cualquier molécula que puede estar adherida al terminal carboxi de un polipéptido. Los grupos de modificación terminales incluyen pero no se limitan a varios polímeros, péptidos o proteínas solubles tales como albúmina para sueros, u otras moléculas que incrementan la vida media sérica de péptidos.

20 **[0018]** El término “arilo” significa, a menos que se indique de otra forma, un sustituyente poliinsaturado, aromático, hidrocarbónico que puede ser un solo anillo o varios anillos (incluyendo pero sin limitarse a, desde uno a tres anillos) que están fusionados juntos o vinculados en una forma covalente. El término “heteroarilo” se refiere a grupos arilos (o anillos) que contienen desde uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O y S, donde los átomos de nitrógeno y de sulfuro son oxidados opcionalmente, y el átomo o los átomos de nitrógeno son cuaternizados opcionalmente. Un grupo heteroarilo puede estar adherido al resto de la molécula por medio de un heteroátomo. Ejemplos no limitantes de grupos heteroarilos y árilos 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-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalino, 5-quinoxalino, 3-quinolilo, y 6-quinolilo. Sustituyentes para cada uno de los sistemas anulares arilos y heteroarilos que se acaban de mencionar se seleccionan de un grupo de sustituyentes aceptables en las tablas que se describen más adelante.

35 **[0019]** Para brevedad, el término “arilo” cuando es utilizado en combinación con otros términos (incluyendo, pero sin limitarse a, ariloxi, aritioxi, aralquilo) incluye anillos arilos y heteroarilos tal como se definió anteriormente. Por lo tanto, el término “aralquilo” o “alcarilo” tiene la intención de incluir a aquellos radicales en los cuales un grupo arilo está adherido a un grupo alquilo (incluyendo pero sin limitarse a, bencilo, fenilo, piridimetilo y similares) incluyendo aquellos grupos alquilo en los cuales un átomo carbono (incluyendo pero sin limitarse a, un grupo metileno) ha sido reemplazado por, por ejemplo, un átomo de oxígeno) incluyendo, pero sin limitarse a, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

45 **[0020]** Un “polímero bifuncional” se refiere a un polímero que contiene dos grupos funcionales discretos que son capaces de reaccionar específicamente con otras fracciones (incluyendo, pero sin limitarse a, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un vinculado bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo en un compuesto activo biológicamente específico, y otro grupo reactivo con un grupo es un segundo componente biológico, pueden utilizarse para formar una conjugación que incluye al primer componente biológicamente activo, al vinculado bifuncional y al segundo componente biológicamente activo. Muchos procedimientos y moléculas vinculadoras son conocidas para la adherencia de varios compuestos a péptidos. Refiérase, por ejemplo, a la aplicación de patente europea número 188,256; las patentes de Estados Unidos números 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 contiene dos o más grupos funcionales discretos que son capaces de reaccionar específicamente con otras fracciones (incluyendo, pero sin limitarse a, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un polímero bifuncional o multifuncional puede ser de cualquier largo o peso molecular deseado, y puede ser seleccionado para suministrar un espacio o conformación deseada entre una o más moléculas enlazadas al polipéptido y su compañero de enlace o el polipéptido.

60 **[0021]** El término “molécula biológicamente activa”, “fracción biológicamente activa” o “agente biológicamente activo” cuando se lo utilizan este documento significa cualquier sustancia que puede afectar cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema, sendero, molécula o interacción biológicas a un organismo, incluyendo, pero sin limitarse a, virus, bacterias, bacteriófagos, transposones, priones, insectos, hongos, plantas, animales y humanos. En particular, tal como se utiliza aquí, moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, cualquier sustancia que tiene el propósito para hacer diagnóstico, curar, mitigar, tratar o prevenir enfermedades en humanos u otros animales, o para mejorar de otra forma el bienestar físico o mental de humanos o animales. Ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, proteínas, enzimas, medicamentos de moléculas pequeñas, medicamentos pesados, medicamentos suaves, carbohidratos, átomos o moléculas

5 inorgánicas, colorantes, lípidos, nucleósidos, radionucleidos, oligonucleótidos, toxinas, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Las clases de agentes biológicamente activos que son adecuadas para su uso con los métodos y composiciones aquí descritos incluyen, pero no se limitan a, medicamentos, pro - medicamentos, radionucleidos, agentes de toma de imágenes, polímeros, antibióticos, fungicidas, agentes antivirales, agentes anti - inflamatorios, agentes antitumorales, agentes cardiovasculares, agentes anti - ansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos, toxinas derivadas microbiana, y similares.

10 **[0022]** “Co- plegadizo” tal como se utiliza aquí, se refiere específicamente a los procesos, reacciones o métodos de repliegue que utilizan por lo menos 2 polipéptidos que interactúan entre sí y resultan en la transformación de los polipéptidos desplegados o plegados inapropiadamente a polipéptidos activos plegados apropiadamente.

15 **[0023]** Una “ventana de comparación”, tal como se utiliza aquí, incluye referencia al segmento de cualquiera de las varias posiciones contiguas seleccionadas de grupo que consiste de 20 a 600, usualmente alrededor de 50 a 200, y más usualmente alrededor de 100 a 150 en los que una secuencia puede compararse a una secuencia referencial del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias hayan sido alineadas óptimamente. Métodos para la alineación de secuencias para su comparación son bien conocidos en la industria. La alineación óptima de secuencias para su comparación puede ser realizada, incluyendo pero sin limitarse a, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, por medio del algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, por el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 85:2444, por medio de implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), por medio de alineación manual e inspección visual (refiérase, por ejemplo, a Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Protocolos Actuales en Biología Molecular) (suplemento de 1995)).

25 **[0024]** Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la identidad secuencial porcentual y la similitud secuencial son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 que son descritos en Altschul et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, y Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. Software para realizar análisis BLAST está públicamente disponible por medio del National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Información Biotecnológica). Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza una longitud de palabra (wordlength – W) de 11, y expectativas (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación para ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores predeterminados una longitud de palabra de 3, y expectativas de 10, y la matriz de puntaje BLOSUM62 (refiérase a Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativas (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas hebras. El algoritmo BLAST es realizado típicamente con el filtro de “baja complejidad” desactivado.

30 **[0025]** El algoritmo BLAST también realiza análisis estadísticos de las similitudes entre dos secuencias (referirse, por ejemplo, a Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:5873-5787). Una medida de similitud suministrada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que suministra una indicación de la probabilidad por la cual un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos podría ocurrir al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico es considerado similar a una secuencia referencial si la probabilidad de la suma más pequeña en comparación con el ácido nucleico de prueba del ácido nucleico referencial es menor a alrededor de 0.02, menor que alrededor de 0.01, o <alrededor de 0.001.

35 **[0026]** El término “variantes conservadoramente modificadas” aplica a secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos. En referencia a secuencias de ácidos nucleicos específicas, el término “variantes conservadoramente modificadas” se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos que son idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Dada la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican a todas las proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU, todos codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en todas las posiciones donde una alanina es especificada por un codón, este puede ser alterado a cualquier codón correspondiente descrito sin alterar al polipéptido codificado. Aquellas variaciones de ácidos nucleicos son “variaciones silenciosas”, que son una de las especies de las variaciones conservadoramente modificadas. Todas las secuencias de ácidos nucleicos aquí descritas que codifican a un polipéptido también describen todas las variaciones silenciosas posibles del ácido nucleico. Una persona con conocimiento reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para el triptófano) puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. Asimismo, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica a un polipéptido es implícita en cada secuencia descrita.

40 **[0027]** En lo que se refiere a secuencias de aminoácidos, una persona con conocimiento reconocerá que sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido, o proteína que altera, añade o elimina un solo aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante conservadoramente modificada” donde la alteración resulta en la sustitución de un

aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Tablas de sustituciones conservadoras que suministran aminoácidos funcionalmente similares son conocidas para aquellos con conocimiento normal en la industria. Aquellas variantes conservadoramente modificadas son adicionales y no excluyen a las variantes polimórficas, homólogos de inter especies, y alelos de los métodos y composiciones aquí descritos.

5 **[0028]** Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos los cuales son sustituciones conservadoras entre sí:

- 10 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);  
 15 7) Serina (S), Treonina (T); y  
 8) Cisteína (C), Metionina (M)

(Refiérase a, por ejemplo, Proteins: Structures and Molecular Properties (Proteínas: Estructuras y Propiedades Moleculares) (W H Freeman & Co.; 2da edición (diciembre de 1993).

20 **[0029]** Los términos “cicloalquilo” y “heterocicloalquilo”, por sí solos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se declare de otra forma, versiones cíclicas de “alquilo” y “heteroalquilo”, respectivamente. Por lo tanto, un cicloalquilo o heterocicloalquilo incluyen enlaces anulares saturados, parcialmente no saturados y completamente no saturados. Adicionalmente, para los heterocicloalquilos, un éter o átomo puede ocupar parte la posición en la cual el heterociclo está adherida al resto de la molécula. Ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Ejemplos de heterocicloalquilos incluyen, pero no se limitan a, 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, tetrahidro-tien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares. Adicionalmente, el término abarca estructuras anulares bicíclicas y tricíclicas. Asimismo, el término “heterocicloalquilenos” por sí solo o como parte de otros sustituyentes significa un radical divalente derivado de un heterocicloalquilo, y el término “cicloalquilenos” por sí solo o como parte de otro sustituyentes significa un radical divalente derivado de un cicloalquilo.

35 **[0030]** “Agente desnaturizante” o “desnaturizador”, tal como se utiliza en este documento, es definido como cualquier compuesto o material que cause un despliegue reversible de una proteína. La fuerza de un agente desnaturizador o desnaturizante se determinará por las propiedades y la concentración del agente desnaturizador o desnaturizante específico. Agentes desnaturizadores o desnaturizantes adecuados pueden ser los agentes caotrópicos, detergentes, orgánicos, solventes mezclables con el agua, fosfolípidos, o una combinación de dos o más de estos agentes. Caotrópicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, urea, guanidina y tiocianato de sodio. Detergentes útiles podrían incluir, pero no se limitan a detergentes fuertes tales como sulfato dodecil de sodio, o éteres de polioxietileno (por ejemplo, detergentes Tween o Tritón), Sarkosyl, detergentes suaves no iónicos (por ejemplo, Digitonina), detergentes suaves catiónicos tales como N->2,3-(Dioleioxi)-propil-N,N,N-trimetilamonio, detergentes leves iónicos (por ejemplo, colato de sodio o desoxicolato de sodio) o detergentes zwitteriónicos incluyendo, pero sin limitarse a, sulfobetainas (Zwittergente), sulfato de 3- (3-cloramidopropil) dimetilamonio-1-propano (CHAPS), y sulfonato de 3- (3-cloramidopropil) dimetilamonio-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO). Solventes orgánicos que se mezclan con el agua tal como acetonitrilo, alcanoles más bajos (especialmente alcanodiolos C<sub>2</sub> – C<sub>4</sub> tales como el etilenglicol) pueden ser utilizados como desnaturizantes. Fosfolípidos útiles en los métodos y composiciones aquí descritas pueden ser fosfolípidos que ocurren naturalmente tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol o derivados o variantes sintéticos de fosfolípidos como dihexanoilfosfatidilcolina o diheptanoilfosfatidilcolina.

50 **[0031]** El término “monto efectivo” tal como se utiliza aquí se refiere al monto del polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) que se administra que aliviará en ciertos grado uno o más de los síntomas de la enfermedad, condición o trastorno que se está tratando. Las composiciones que contienen al polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) aquí descritos pueden administrarse para tratamientos profilácticos, mejoradores y / o terapéuticos.

55 **[0032]** Los términos “mejorar” o “mejorando” significan el incrementar o prolongar la potencia o duración de un efecto deseado. Por lo tanto, en referencia a mejorar el efecto de los agentes terapéuticos, el término “mejorando” se refiere a la habilidad de incrementar o prolongar, la potencia o duración, el efecto de otros agentes terapéuticos en un sistema. Un “monto efectivo de mejora”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a un monto adecuado para mejorar el efecto de otro agente terapéutico en un sistema deseado. Cuando se usa en un paciente, montos efectivos para este uso dependerán de la gravedad y la etapa de la enfermedad, desorden o condición, terapias previas, el estado de salud del paciente y la respuesta a los medicamentos, y el juicio del médico tratante.

65

**[0033]** Tal como se utiliza aquí, el término “eucariota” se refiere a los organismos que pertenecen al dominio filogenético de Eucarya tales como animales (incluyendo, pero sin limitarse a, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluyendo, pero sin limitarse a, monocotiledóneas, dicotiledóneas, algas, etcétera), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios, protistas, etc.

**[0034]** Los términos “grupo funcional”, “fracción activa”, “grupo de activación”, “grupo que abandona”, “sitio reactivo”, “grupo químicamente reactivo” y “fracción químicamente reactiva” son utilizadas en la industria y en este documento para referirse haciendo distinción de porciones o unidades definibles de una molécula. Los términos son algo sinónimos en la industria química y son utilizados en este documento para indicar las porciones de moléculas que realizan alguna función o actividad y que son reactivas con otras moléculas.

**[0035]** El término “halógeno” incluye flúor, cloro, yodo y bromo.

**[0036]** El término “heteroalquilo”, por sí solo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique de otra forma, una cadena estable lineal o ramificada, o un radical cíclico hidrocarbónico, o sus combinaciones, que consisten del número declarado de átomos carbonos y por lo menos un heteroátomo seleccionado de un grupo que consiste de O, N, Si y S, donde los átomos de nitrógeno y sulfuro pueden ser oxidados opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede ser cuaternizado opcionalmente. Los heteroátomos de O, N, S y Si pueden ser colocados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la cual el grupo alquilo está adherida al resto de la molécula. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)-CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)}_2\text{-CH}_3$ ,  $-\text{CH=CHO-CH}_3$ ,  $-\text{Si(CH}_3\text{)}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH=N-OCH}_3$ , y  $-\text{CH=CH-N(CH}_3\text{)-CH}_3$ . Hasta dos átomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo,  $-\text{CH}_2\text{-NH-OCH}_3$  y  $-\text{CH}_2\text{-O-Si(CH}_3\text{)}_3$ . Así mismo, el término “heteroalquilenos” por sí solo o como parte de un sustituyente significa una radical divalente derivada de heteroalquilo, tal como se usó de ejemplo, pero sin limitarse a,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$  y  $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$ . Para los grupos heteroalquilenos, los mismos o diferentes heteroátomos también pueden ocupar uno o ambos términos de la cadena (incluyendo, pero sin limitarse a, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino, aminoalquilenos, y similares). Aún más, para grupos enlazadores alquilenos y heteroalquilenos, ninguna orientación del grupo de vinculación es implicada por la dirección en la cual la fórmula del grupo vinculante es escrita. Por ejemplo, la fórmula  $-\text{C(O)}_2\text{R}'$  representa a  $-\text{C(O)}_2\text{R}'$  y  $-\text{R}'\text{C(O)}_2$ .

**[0037]** Los términos “idéntico” o “identidad” porcentual, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o sub-secuencias que son la misma. Las secuencias son “sustancialmente idénticas” si tienen un porcentaje de residuos o nucleótidos de aminoácidos que son los mismos (es decir, alrededor de un 60% de identidad, opcionalmente alrededor de un 65%, alrededor de un 70%, alrededor del 75%, alrededor de un 80%, alrededor del 85%, alrededor de un 90%, o alrededor de un 95% de identidad en una región específica), cuando se comparan y se alinean para una máxima correspondencia en una ventana de comparación, o región designada tal como se midió usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por medio de una alineación manual o inspección visual. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. La identidad puede existir en una región de por lo menos alrededor de 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o en una región de 75 - 100 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o, donde no se especifique, a lo largo de toda la secuencia de un polinucleótido o polipéptido.

**[0038]** Para una comparación secuencial, comúnmente una secuencia actúa como una secuencia referencial, a la cual las secuencias de prueba se comparan. Cuando se usa un algoritmo de comparación secuencial, las secuencias de prueba y la referencial se ingresan a una computadora, las coordenadas de sus secuencias son designadas, si es que fuese necesario, y los parámetros del programa del algoritmo secuencial son designados. Los parámetros predeterminados del programa pueden ser utilizados, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación secuencial calcula entonces las identidades secuenciales porcentuales para las secuencias de prueba en relación a la secuencia referencial, basándose en los parámetros del programa.

**[0039]** El término “aislado”, cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, denota que el ácido nucleico o proteína está libre de por lo menos algunos de los componentes celulares con los que está asociado en un estado natural, o que el ácido nucleico o proteína concentrada a un nivel más alto que la concentración de su producción in vivo o in vitro. Puede estar en un estado homogéneo. Las sustancias aisladas pueden estar en un estado seco o semi-seco, o en una solución, incluyendo pero sin limitarse a una solución acuosa. Puede ser un componente de una composición farmacéutica que incluye además portadores y / o excipientes farmacéuticamente aceptables. La pureza y la homogeneidad son determinadas típicamente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis con gel de poliacrilamida o cromatografía con líquidos de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En específico, un gen aislado separado de marcos de lectura abiertos que rodean al gen y codifican una proteína aparte del gen de interés. El término “purificado” se refiere a un ácido nucleico o proteína que da lugar a una banda sustancialmente única en un gel electroforético. Particularmente, podría significar que el ácido nucleico o la proteína es por lo menos 85% pura, por lo menos 90% pura, por lo menos 95% pura, por lo menos 99% pura o más pura.

5 [0040] El término “enlace” o “vinculador” es utilizado en este documento para referirse a grupos o enlaces que son formados normalmente como el resultado de una reacción química y enlaces covalentes. Enlaces hidrolíticamente estables significan que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con agua a valores útiles de pH, incluyendo pero sin limitarse a, bajo condiciones fisiológicas durante un período de tiempo largo, tal vez hasta indefinidamente. Enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significa que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, incluyendo por ejemplo, la sangre. Enlaces enzimáticamente de inestables o degradables significan que los enlaces pueden ser degradados por una o más enzimas. Tal como se entiende en la industria, PEG y polímeros relacionados podrían incluir enlaces degradables en el esqueleto del polímero o en el grupo vinculado al esqueleto del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula del polímero. Por ejemplo, los enlaces de éster formados por la reacción de ácidos PEG carboxílico o activados por ácidos PEG carboxílico con grupos de alcohol en un agente biológicamente activo generalmente hidrolizan bajo condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen pero no se limitan a enlaces de carbonatos; enlaces de imina que resultan de la reacción de un amino y un aldehído; enlaces de ésteres fosfatos formados al reaccionar un alcohol con un grupo fosfato; enlaces de hidrazonas que son la reacción producto de una hidrazida y un aldehído; enlaces de acetales que son la reacción producto de un aldehído y un alcohol; enlaces de ortoésteres que son la reacción producto de un formato y un alcohol; enlaces de péptidos formados por un grupo amino, incluyendo, pero sin limitarse a, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces de oligonucleótidos formados por un grupo fosforamida, incluyendo, pero sin limitarse a, el extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

10 [0041] Tal como se utiliza aquí, el término “medio” o “media” incluye cualquier medio, solución, sólido, semisólido o soporte rígido que podría dar respaldo o contener cualquier célula anfitriona, incluyendo células anfitrionas bacterianas, células anfitrionas de levadura, células anfitrionas de insectos, células anfitrionas vegetales, células anfitrionas Eucariotas, células anfitrionas de mamíferos, células CHO, células anfitrionas procarionas, E. coli, o células anfitrionas pseudomonas y contenidos celulares. Por lo tanto, el término puede abarcar medios en los cuales la célula anfitriona ha crecido, por ejemplo, medios en los cuales el polipéptido ha sido secretado, incluyendo un medio antes o después de un paso de proliferación. El término también puede abarcar amortiguadores o reactivos que contienen lisados celulares anfitriones, tal como en el caso donde el polipéptido que es producido intracelularmente y las células anfitrionas son lisadas o interrumpidas para liberar el polipéptido.

15 [0042] Un “metabolito” de un polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) aquí presentados es un derivado de ese polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) que se forma cuando el polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) es metabolizarlo. El término “metabolito activo” se refiere a un derivado biológicamente activo de un polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) que se forma cuando el polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) es metabolizado. El término “metabolizado” se refiere a la suma de procesos (incluyendo, pero sin limitarse a, reacciones de hidrólisis y reacciones catalizadas por enzimas) por los cuales una sustancia particular es cambiada por un organismo. Más información acerca de metabolismos puede ser obtenida de The Pharmacological Basis of Therapeutics (La Fase Farmacológica Terapias), 9na edición, McGraw-Hill (1996). Los metabolitos del polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) aquí presentados pueden identificarse por la administración del polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) a un anfitrión y análisis de muestras de tejidos del anfitrión, o por medio de incubación del polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) con células hepáticas in vitro y el análisis de los compuestos resultantes.

20 [0043] El término “modificado”, tal como se utiliza aquí se refiere a la presencia de una modificación post traducción en un polipéptido. La forma del término “(modificada)” significa que los polipéptidos mencionados son modificados opcionalmente, eso es, los polipéptidos en cuestión pueden ser modificados o no modificados.

25 [0044] Tal como se utiliza aquí, el término “vida media sérica modulada” se refiere al cambio positivo o negativo en la vida media de circulación de un polipéptido (modificado) en relación a su forma no modificada. La vida media sérica es medida al tomar muestras de sangre en varios momentos después de la administración del polipéptido, y determinar la concentración de aquella molécula en cada muestra. Una correlación de la concentración sérica en relación al tiempo permite el cálculo de la vida media sérica. Una vida media sérica incrementada deseable tiene por lo menos alrededor de dos veces, pero un incremento pequeño puede ser útil, por ejemplo cuando permite un régimen de dosis satisfactorio o evita un efecto tóxico. En algunas secciones, el incremento es por lo menos alrededor de 3 veces, alrededor de cinco veces o alrededor de 10 veces.

30 [0045] El término “vida media terapéutica modulada” tal como se utiliza en este documento significa el cambio positivo o negativo en la vida media del monto terapéuticamente efectivo de un polipéptido (modificado), en relación a su forma no modificada. La vida media terapéutica es medida al valorar las propiedades farmacocinéticas y / o farmacodinámicas de la molécula en varios momentos después de la administración. Una vida media terapéutica incrementada permite un régimen de dosis beneficioso específico, una dosis total beneficiosa específica, o evita un efecto no deseado. En algunas secciones, la vida media terapéutica incrementada resulta de un incremento en potencia, una vinculación incrementada o reducida de la molécula modificada a su objetivo, una descomposición incrementada o reducida de la molécula por enzimas tales como las proteasas, o un incremento o reducción en otro parámetro o mecanismo de acción de la molécula no modificada.

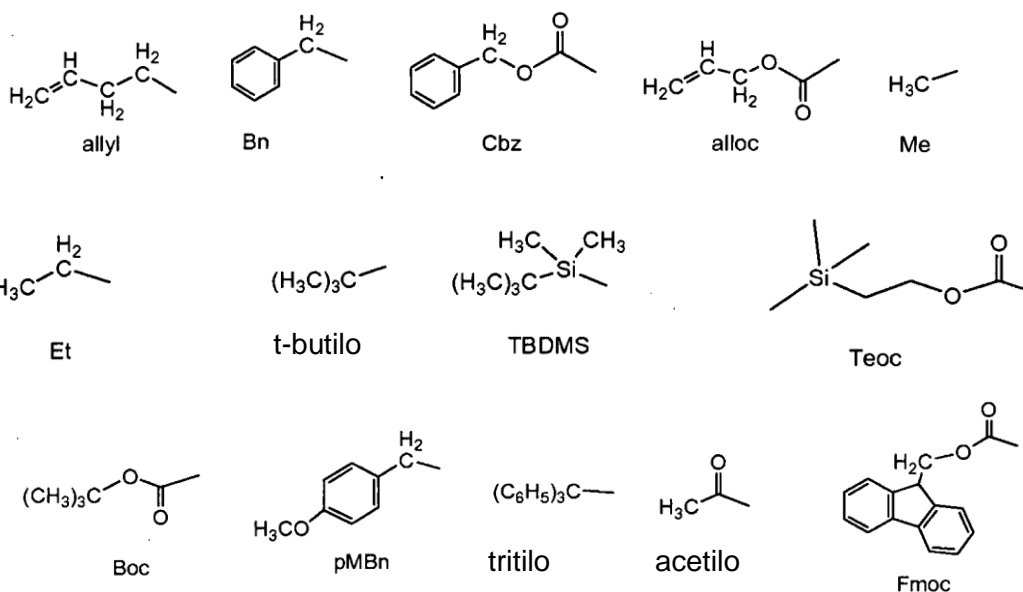


- 5 **[0046]** Tal como se utiliza aquí, el término “no eucariota” se refiere a organismos no eucariotas. Por ejemplo, un organismo no eucariota puede pertenecer a la Eubacteria (incluyendo, pero sin limitarse a, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, etc.) el dominio filogenético, o el dominio filogenético Archaea (incluyendo, pero sin limitarse a, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium* como *Haloferax volcanii* y especies *Halobacterium* NRC-1, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *horikoshii* *Pyrococcus*, *Aeuryopyrum pernix*, etc.).
- 10 **[0047]** Un “aminoácido no natural” se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína; otros términos que pueden ser utilizados en una forma sinónima con el término “aminoácido no natural” son “aminoácido codificado no naturalmente”, “aminoácido no natural”, “aminoácido que ocurre no naturalmente” y varias versiones con guiones y sin guiones parecidas. El término “aminoácido no natural” incluye, pero no se limita a, aminoácidos que ocurren naturalmente por medio de una modificación de un aminoácido codificado naturalmente (incluyendo pero sin limitarse a, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína) pero en sí no son incorporados a una cadena de polipéptidos creciente por el complejo de traducción. Ejemplos de aminoácidos que ocurren naturalmente que no son codificados naturalmente incluyen, pero no se limitan a, N-acetilglucosaminil-L-serina, N-acetilglucosaminil-L-treonina, y O-fosfotirosina.
- 15 **[0048]** El término “ácido nucleico” se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o ribonucleótidos y sus polímeros en una forma mono o doble catenaria. A menos que se limite específicamente, el término abarca a ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de enlace similares a las del ácido nucleico referencial y son metabolizadas en una forma similar a nucleótidos que ocurren naturalmente. A menos que se limite específicamente de otra forma, el término se refiere a análogos de oligonucleótidos que incluyen PNA (ácido peptidonucleico), análogos de ADN usado en tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforoamidatos, y similares). A menos que se indique de otra forma, una secuencia de ácido nucleico específica también abarca implícitamente sus variantes modificadas conservadoramente (incluyendo, pero sin limitarse a, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, sustituciones de cordones degenerados pueden lograrse al generar secuencias en las cuales la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados es sustituida con residuos de base mixta y / o desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* (Res. Ácido nucleico) 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); y Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* (sondas *Mol. Cell.*) 8:91-98 (1994)).
- 20 **[0049]** “Agente oxidante”, tal como se utiliza aquí en referencia al re - plegamiento proteínico, se define como cualquier compuesto o material que es capaz de remover un electrón de un compuesto que está siendo oxidado. Agentes de oxidación adecuada incluyen, pero no se limitan a, glutatión oxidado, cistina, cistamina, ditiotreitól oxidado, erythreitól oxidado, y oxígeno. Una amplia gama de agentes oxidantes son adecuados para su utilización en los métodos y composiciones aquí descritos.
- 25 **[0050]** Tal como se utiliza aquí, el término “glicol polialquileño” se refiere a glicol polietileno, glicol polipropileno, glicol polibutileno y sus derivados. El término “glicol polialquileño” cubre a los polímeros lineales y ramificados y a pesos moleculares promedio de entre 1 kDa y 100 kDa. Otros ejemplos de secciones se listan, por ejemplo, en catálogos comerciales de proveedores, tales como el catálogo de Shearwater Corporation “Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications” (“Glicol Polietileno y sus Derivados para Aplicaciones Biomédicas”) (2001).
- 30 **[0051]** Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan intercambiamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido aplica igualmente a una descripción de un péptido y a una descripción de una proteína, y viceversa. Los términos aplican a polímeros de aminoácidos que ocurren naturalmente así como a polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos aminoácidos de un aminoácido que no ocurre naturalmente. Tal como se utiliza en este documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier largo, incluyendo proteínas completas, donde los residuos de aminoácidos están vinculados por enlaces covalentes de péptidos.
- 35 **[0052]** El término “modificado después de la traducción” se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que ocurre a un aminoácido después de que ha sido incorporado en una cadena de polipéptidos. El término abarca, sólo en forma de ejemplo, modificaciones in vivo co - interpretantes, modificaciones in vitro co - interpretantes (tales como un sistema de traducción libre de células), modificaciones in vivo post - interpretantes y modificaciones in vitro post - interpretantes.
- 40 **[0053]** Un “pro - medicamento” se refiere a un activo que es convertido en un medicamento paterno in vivo. Los pro - medicamentos son útiles porque, en algunas situaciones, podrían administrarse más fácilmente que un medicamento paterno. Podrían, por ejemplo, ser disponibles biológicamente por medio de una administración oral mientras el medicamento paterno no lo es. El pro - medicamento también puede tener una solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas por sobre el medicamento paterno.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

**[0054]** En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) se administran a un paciente susceptible o que tiene el riesgo de una enfermedad, trastorno o condición específica. Tal monto es definido como un "monto profilácticamente efectivo". En este uso, los montos precisos también dependen del estado de salud, peso y similares del paciente. Es considerado como buena práctica dentro del conocimiento de la industria, que para determinar aquellos montos profilácticamente efectivos se pueden utilizar experimentación rutinaria. (Por ejemplo, un experimento clínico de escalada de dosis).

**[0055]** El término "protegido" se refiere a la presencia de un "grupo protector" o fracción que previene la reacción del grupo funcional químicamente reactivo bajo ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que está siendo protegido. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo fuese una amina o hidrazida, el grupo protector puede seleccionarse del grupo de terc-butiloxycarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser un ortopiridildisulfuro. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como un ácido butanóico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser un bencilo o un grupo alquilo tal como metilo, etilo, o terc-butilo. Otros grupos protectores conocidos en la industria también pueden ser utilizados en, o con los métodos y composiciones aquí descritos, incluyendo grupos fotolables tales como Nvoc y MeNvoc.

**[0056]** únicamente en forma de ejemplo, los grupos bloqueadores / protectores pueden seleccionarse de:



**[0057]** Otros grupos protectores son descritos en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos Protectores en Síntesis Orgánica), 3ra Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1999.

**[0058]** Una "célula anfitriona recombinante" o "célula anfitriona" se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, sin importar el método utilizado para su inserción, por ejemplo, captación directa, transducción, apareamiento f u otros métodos conocidos en la industria para crear células anfitrionas recombinantes. El polinucleótido exógeno puede ser mantenido como un vector no integrador, por ejemplo, un plásmido, o alternativamente, puede ser integrado en el genoma anfitrión.

**[0059]** "Activo reductor" tal como se utiliza en este documento en referencia al repliegue proteínico, se define como cualquier compuesto o material que mantiene a los grupos sulfhidrilos en el estado reducido y reduce los enlaces intra- o inter moleculares del disulfuro. Activos reductores adecuados incluyen, pero no se limitan a, ditiotritol (DTT), 2-mercaptoetanol, ditioeritritol, cisteína, cisteamina (2-aminoetanol), y glutatión reducido. Una amplia gama de activos reductores son apropiados para su utilización en los métodos y composiciones aquí descritos.

**[0060]** "Repliegue" tal como se utiliza en este documento es cualquier proceso, reacción o método que transforma el enlace de disulfuro que contiene polipéptidos de un estado plegado o desplegado inapropiadamente de una conformación natural o plegada apropiadamente en referencia a los enlaces de disulfuro.

**[0061]** La frase "hibrida selectivamente (o específicamente) a" se refiere al enlace, doblaje o hibridación de una molécula única a una secuencia específica de nucleótidos bajo condiciones rigurosas de hibridación cuando la

secuencia está presente en una mezcla compleja (incluyendo, pero sin limitarse a, celular total o biblioteca de ADN o ARN).

5 **[0062]** La frase “condiciones rigurosas de hibridación” se refiere a condiciones de baja fuerza iónica y de alta temperatura tal como se conoce en la industria. Típicamente, bajo condiciones rigurosas una sonda hibridará a su sub secuencia objetiva en una mezcla compleja de ácido nucleico (incluyendo, pero sin limitarse a, celular total o biblioteca de ADN o ARN) pero no hibrida a otras secuencias en la mezcla compleja. Condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes (Técnicas de Laboratorio en Bioquímica y Biología Molecular - Hibridación con Sondas Nucleicas), "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (“revisión general de la hibridación y estrategia de ensayos de ácidos nucleicos”) (1993). Generalmente, las condiciones rigurosas son seleccionadas son de alrededor de 5 - 10 °C más bajos que el punto de derretimiento térmico  $T_m$  para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. La  $T_m$  es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración nucleico definidas) a la cual el 50% de las sondas complementarias al objetivo y brisa a la secuencia objetiva en el punto de equilibrio (en la forma en que las secuencias objetivo están presentes en exceso, a la  $T_m$ , el 50% de las sondas están ocupadas en el punto de equilibrio). Las condiciones rigurosas pueden ser aquellas en las cuales la concentración salina es menor que alrededor de 1.0 M de concentración de iones de sodio, típicamente alrededor de 0.01 a 1.0 M de concentración de iones de sodio (u otras sales) a un pH 7.0 a 8.3 y la temperatura de por lo menos alrededor de 30 °C para sondas cortas (incluyendo pero sin limitarse a, 10 a 50 nucleótidos) y por lo menos alrededor de 60 °C para sondas largas (incluyendo, pero sin limitarse a, mayores a 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden lograrse con la adición de agentes desestabilizadores tales como formamida. Para hibridaciones selectivas o específicas, una señal positiva podría ser por lo menos 2 veces la hibridación del entorno, opcionalmente 10 veces la hibridación del entorno, ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas pueden ser las siguientes: 50% de formamida, 5X SSC, y 1% de SDS, incubándose a 42 °C, o 5X SSC, 1% de SDS, incubándose a 65 °C, con un lavado en 0.2X SSC, y 0.1 por ciento de SDS a 65 °C. Aquellos lavados pueden ser realizados durante 5, 15, 30, 60, 120 o más minutos.

30 **[0063]** El término “sujeto” tal como se utiliza aquí, se refiere a un animal, en algunas secciones a un mamífero, y en otras secciones un humano, que es objeto del tratamiento, observación o experimento.

35 **[0064]** El término “sustancialmente purificado” se refiere a un polipéptido que puede ser sustancialmente o esencialmente libre de compuestos que normalmente podrían acompañarlo o interactuar con la proteína tal como se la encuentra en su entorno natural, es decir, una célula nativa, o célula anfitriona en el caso de un polipéptido producido en forma recombinante. Un polipéptido que podría ser sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas que tienen menos de alrededor del 30%, menos de alrededor del 25%, menos de alrededor del 20%, menos de alrededor del 15%, menos de alrededor del 10%, menos de alrededor del 5%, menos de alrededor del 4%, menos de alrededor del 3%, menos de alrededor del 2%, o menos de alrededor del 1% (en peso seco) de proteínas contaminantes. Cuando el polipéptido o sus variantes son producidas en una forma recombinante por las células anfitrionas, la proteína puede estar presente alrededor de un 30%, alrededor de un 25%, alrededor de un 20%, alrededor de un 15%, alrededor de un 10%, alrededor de un 5%, alrededor de un 4 por ciento, alrededor de un 3%, alrededor de un 2%, o alrededor de 1%, o menos del peso seco de las células. Cuando el polipéptido o su variantes producida recombinantemente por las células anfitrionas, la proteína puede estar presente en el medio de cultivo en alrededor de 5 g / litros, alrededor de 4 g / litros, alrededor de 3 g / litros, alrededor de 2 g / litros, alrededor de 1 g / litros, alrededor de 750 mg / litros, alrededor de 500 mg / litros, alrededor de 250 mg / litros, alrededor de 100 mg / litros, alrededor de 50 mg / litros, alrededor de 10 mg / litros o alrededor de 1 mg / litros o menos del peso seco de las células. Por lo tanto, un polipéptido “sustancialmente purificado” producido de acuerdo a los métodos aquí descritos puede tener un nivel de pureza de por lo menos alrededor de un 30%, por lo menos alrededor de un 35%, por lo menos alrededor de un 40%, por lo menos alrededor de un 45%, por lo menos alrededor de un 50%, por lo menos alrededor de un 55%, por lo menos alrededor de un 60%, por lo menos alrededor de un 65%, por lo menos alrededor de 70%, específicamente, un nivel de pureza de por lo menos alrededor de un 75%, 80%, 85%, y más específicamente, un nivel de pureza de por lo menos alrededor de un 90%, un nivel de pureza de por lo menos alrededor de un 95%, un nivel de pureza de por lo menos alrededor de un 99% o más tal como se determina por los métodos apropiados tales como el análisis SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar.

60 **[0065]** El término “sustituyentes” incluye pero no se limita a “sustituyentes que no interfieren”. “Sustituyentes que no interfieren” son aquellos grupos que producen compuestos estables. Sustituyentes o radicales que no interfieren adecuados incluyen, pero no se limitan a, halo, alquilo  $C_1-C_{10}$ , alqueno  $C_2-C_{10}$ , alqueno  $C_2-C_{10}$ , alquino, alcoxi  $C_1-C_{10}$ , aralquilo  $C_5-C_{12}$ , cicloalquilo  $C_3-C_{12}$ , cicloalqueno  $C_4-C_{12}$ , fenilo, fenilo sustituido, tolueno, xileno, bifenilo, alcoxialquilo  $C_2-C_{12}$ , alcoxiarilo  $C_5-C_{12}$ , ariloxialquilo  $C_5-C_{12}$ , oxiarilo  $C_7-C_{12}$ , alquilsulfino  $C_1-C_6$ , alquilsulfono  $C_1-C_{10}$ , - (CH<sub>2</sub>) O- (alquilo  $C_1-C_{10}$ ) en la 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  $C_1-C_{10}$ ), -C (O) - (alquilo  $C_1-C_{10}$ ), C<sub>2</sub> C<sub>10</sub> alcoxialquilo, -C (O) O- (alquilo  $C_1-C_{10}$ ), -OH, -SO<sub>2</sub>, = S, -COOH, -NR<sub>2</sub>, carbonilo, -C (O) - (alquilo  $C_1-C_{10}$ ) -CF<sub>3</sub>, -C (O) -CF<sub>3</sub>, -C (O) NR<sub>2</sub>, - (arilo  $C_1-C_{10}$ ) -S- (arilo  $C_6-C_{10}$ ), -C (O) - arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), - (CH<sub>2</sub>) mO - (CH<sub>2</sub>) O- (alquilo

C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) en el 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>, su sales, y similares. Cada grupo R en la lista anterior es seleccionado independientemente del grupo que consiste de H, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, o alcarilo. Donde los grupos sustituyentes son especificados por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de la izquierda a la derecha, ellas abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de escribir la estructura desde la derecha a la izquierda, por ejemplo, -CH<sub>2</sub>O- es equivalente a -OCH<sub>2</sub>-.

**[0066]** Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos a menudo referidos como alquilenos, alqueniil, heteroalquilenos, heteroalqueniil, alquiniilo, cicloalquiniil, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueniilo y heterocicloalqueniilo) puede ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados de, pero sin limitarse a: -OR, =O, =NR, =N-OR, -NR<sub>2</sub>, -SR, -halogeno, -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 desde cero hasta (2m' + 1), donde m' es el número total de átomos carbonos en aquel radical. Cada grupo R en la lista anterior es seleccionado independientemente de un grupo que consiste de hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, incluyendo, pero sin limitarse a, arilo sustituido con uno - tres halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, los grupos alcoxi o tioalcoxi, o los grupos aralquilos. Cuando dos grupos R son adheridos al mismo átomo de nitrógeno, pueden ser combinados con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o siete miembros. Por ejemplo, -NR<sub>2</sub> tiene el propósito de incluir, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. De lo que se acaba de mencionar en referencia a los sustituyentes, una persona con conocimiento en la industria entenderá que el término "alquilo" tiene el propósito de incluir grupos que contienen átomos de carbón enlazados a grupos que no sean grupos de hidrógeno, tales como haloalquilos (incluyendo, pero sin limitarse a, -CF<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) y acilos (incluyendo, pero sin limitarse a, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, y similares).

**[0067]** Similares a los sustituyentes descritos para los radicales alquilos, sustituyentes para grupos arilos y heteroarilos varían y se seleccionan de, pero no se limitan a, OR, =O, =NR, =N-OR, -NR<sub>2</sub>, -SR, -halogeno, -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(F)<sub>2</sub>, alcoxi fluoro (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), y alquilo fluoro (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), en un número que varía desde cero al número total de valencias abiertas en el sistema anular automático; y donde cada grupo R en la lista anterior es seleccionado independientemente de hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo y heteroarilo.

**[0068]** En aplicaciones terapéuticas, las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) son administrados a un paciente que ya sufre de una enfermedad, condición o trastorno, en un monto suficiente para curar o por lo menos contrarrestar parcialmente los síntomas del trastorno, enfermedad o desorden. Tal monto es definido como un "monto terapéuticamente efectivo", y dependerá de la gravedad y de la etapa de la enfermedad, desorden o condición, terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los medicamentos, y el juicio del médico tratante. Se considera como buena práctica dentro de la industria que se determine aquellos montos terapéuticamente efectivos por medio de experimentación rutinaria (por ejemplo, un experimento clínico de escalada de dosis).

**[0069]** Tal como se utiliza aquí, el término "ligando de prueba" se refiere a un activo, que puede ser un compuesto, una molécula o un complejo, que está siendo probado para su habilidad para enlazarse a un polipéptido de aminoácidos no naturales, tal como una proteína o un complejo de proteínas que en sus formas nativas son conocidas por asociarse con una causa de una enfermedad o condición en un organismo vivo, tal como un vertebrado, particularmente un mamífero y más específicamente un humano. Puesto que la vinculación de un ligando a su polipéptido de aminoácidos no naturales debe ocurrir para que el ligando tenga un efecto directo en el polipéptido de aminoácidos no naturales, la vinculación tal como lo indica este método de ensayo es una fuerte indicación del potencial terapéutico de un ligando identificado tal como se describe en este documento.

**[0070]** Un ligando de prueba que puede evaluarse por este método puede ser virtualmente cualquier reactivo, incluyendo, pero sin limitarse a, metales, polipéptidos, proteínas, lípidos, polisacáridos, polinucleótidos y moléculas orgánicas pequeñas. Un ligando de prueba que ha demostrado vincular a un polipéptido de aminoácidos no naturales se lo denomina como un ligando. Mezclas complejas de sustancias, incluyendo, pero sin limitarse a, extractos de productos naturales, que incluyen más de un ligando de prueba pueden examinarse y si existe una respuesta positiva (es decir, si la vinculación al polipéptido de aminoácidos no naturales ocurre), el ligando que se vinculó al polipéptido de aminoácidos no naturales puede ser purificado de la mezcla antes de seguir con la evaluación de su potencial terapéutico.

**[0071]** El término "tratamiento" es utilizado para referirse a los tratamientos profilácticos y / o terapéuticos.

**[0072]** Tal como se utiliza aquí, el término "polímero soluble en agua" se refiere a cualquier polímero que es soluble en solventes acuosos. La vinculación de polímeros solubles en agua a un polipéptido puede resultar en cambios que incluyen, pero no se limitan a, un incremento o modulación de la vida media sérica, o un incremento o modulación de la vida media terapéutica en relación a la forma no modificada, inmunogenicidad modulada, características de asociación física modulada tales como agregación y formación de multímeros, vinculación alterada de receptores,

vinculación alterada a uno o más compañeros de vinculación, y una dimerización o multimerización del receptor alterado. El polímero soluble en agua puede o puede no tener su propia actividad biológica y podría ser utilizado como un vinculador para adherirse al polipéptido de otras sustancias, incluyendo, pero sin limitarse a uno o más polipéptidos, o una o más moléculas biológicamente activas. Polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, glicol de polietileno, propionaldehído de glicol de polietileno, mono alcoxi C1-C10 o sus derivados de ariloxi (descrito en la patente de Estados Unidos número 5,252,714), monometoxipolietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliaminoácidos, anhídrido de diviniléter maleico, N- (2-hidroxiopropil) metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano, incluyendo sulfato de dextrano, glicol de polipropileno, óxido de polipropileno / copolímero de óxido de etileno, poliol polioxiethylado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glicanos, celulosa y derivados de celulosa, incluyendo, pero sin limitarse a metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y sus derivados, polipéptidos, polialquilenglicol y sus derivados, copolímeros de polialquilenglicoles y sus derivados, éteres etílicos de polivinilo, y alfa-beta-poli [(2-hidroxietil) -DL-aspartamida, y similares, o mezclas de los mismos. Ejemplos de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a polietilenglicol y albúmina sérica.

**[0073]** A menos que se indique de otra forma, métodos convencionales de espectroscopia, NMR, HPLC, química proteínica, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, son utilizadas dentro de las técnicas de la industria.

**[0074]** Los compuestos (incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos ya mencionados) aquí presentados incluyen compuestos clasificados isotópicamente, que son idénticos a aquellos indicados en varias fórmulas y estructuras en este documento, pero debido al hecho de que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente a la masa atómica o número de masa que se encuentra usualmente en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse a estos compuestos incluyen isótopos de hidrógeno, carbón, 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 clasificados isotópicamente aquí descritos, por ejemplo aquellos en los cuales los isótopos radioactivos tales como  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  están incorporados, son útiles en ensayos de distribución de tejidos de medicamentos y / o sustratos. Además, la sustitución con isótopos tales como el deuterio, es decir,  $^2\text{H}$ , puede tener ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, un incremento en la vida media in vivo o una reducción en los requerimientos de las dosis.

**[0075]** Algunos de los compuestos aquí mencionados (incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos ya mencionados) tienen átomos carbonos asimétricos y por lo tanto pueden existir como enantiómeros o diastereómeros. Las mezclas diastereoméricas pueden separarse en sus diastereómeros en base a sus diferencias químicas físicas por medio de métodos conocidos, por ejemplo, por cromatografía y / o cristalización fraccional. Los enantiómeros pueden separarse al convertir la mezcla enantiomérica en una mezcla diastereomérica al reaccionar un compuesto ópticamente activo apropiado (por ejemplo, alcohol), separando los diastereómeros y convirtiendo (por ejemplo, hidrolizando) los diastereómeros individuales a los correspondientes enantiómeros puros. Todos esos isómeros, incluyendo diastereómeros, enantiómeros y sus mezclas son considerados como partes de las composiciones aquí descritas.

**[0076]** En secciones adicionales, los compuestos aquí descritos (incluyendo, pero sin limitarse a aminoácidos no naturales, poli péptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos ya mencionados) son utilizados en forma de pro - medicamentos. En secciones adicionales, los compuestos aquí descritos (incluyendo, pero sin limitarse a aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos ya mencionados) son metabolizados en el momento de su administración a un organismo que necesita producir un metabolito que a su vez es usado para producir un efecto deseado, incluyendo un efecto deseado terapéutico. En secciones adicionales existen metabolitos activos de aminoácidos no naturales y de polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados).

**[0077]** Los métodos y formulaciones aquí descritas incluyen el uso de óxidos-N, formas cristalinas (también conocidas como polimorfos), o sales farmacéuticamente aceptables de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados). En algunas situaciones, aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) podrían existir como tautómeros. Todos los tautómeros están incluidos dentro del alcance de los aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) aquí presentados. Adicionalmente, los aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) aquí descritos pueden existir en formas no solvatadas o solvatadas con solventes farmacéuticamente aceptables tales como el agua, etanol y similares. Las formas solvatadas de los aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) aquí presentados también son considerados como presentados en este documento.

**[0078]** Aquellos con conocimiento en industria reconocerán que algunos compuestos aquí mencionados (incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos

para producir cualquiera de los compuestos ya mencionados) pueden existir en varias formas tautoméricas. Todas esas formas tautoméricas son consideradas como parte de las composiciones aquí descritas. También, por ejemplo, todas las formas enol - ceto de cualquier compuesto (incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos ya mencionados) aquí mencionados son considerados como parte de las composiciones aquí descritas.

**[0079]** Algunos de los compuestos aquí descritos (incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos ya mencionados) son ácidos y podrían formar una sal con un catión farmacéuticamente aceptable. Algunos de los compuestos aquí mencionados (incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) y reactivos para producir cualquiera de los compuestos ya mencionados) pueden ser básicos y asimismo, pueden formar una sal con un anión farmacéuticamente aceptable. Todas esas sales, incluyendo di- sales están dentro del alcance de las composiciones aquí descritas y pueden ser preparadas por medio de métodos convencionales. Por ejemplo, las sales pueden ser preparadas al contactar las entidades ácidas y básicas, en medios acuosos, no acuosos o parcialmente acuosos. Las sales son recuperadas al usar por lo menos una de las siguientes técnicas: filtración, precipitación con un no solvente seguido de filtración, evaporación del solvente de, o, en el caso de soluciones acuosas, liofilización.

**[0080]** Las sales incluyen, por ejemplo: (1) sales de adición ácida, formadas con ácidos inorgánicos tales como el ácido hidrocórico, el ácido hidrobromico, el ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como el ácido acético, el ácido propiónico, el 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 cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-metilbencil- [2.2.2] oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 4,4'-metilénbis (3-hidroxi-2-eno-1- carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido lauril sulfúrico, 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 paternal es reemplazado por un ion metálico, por ejemplo, un ion metal alkali, un ion alcalinotérreo, o un ion de aluminio; o coordina con una base orgánica. Bases orgánicas aceptables incluyen hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, y similares.

**[0081]** Debe entenderse que una referencia a una sal incluye sus formas de adición solventes o sus formas cristalinas, particularmente solvatos o polimorfos. Los solvatos contienen montos estequiométricos o no estequiométricos de un solvente, y a menudo son formados durante el proceso de cristalización. Los hidratos son formados cuando el solvente de esa agua, o alcoholatos son formados cuando el solvente es alcohol. Los polimorfos incluyen los diferentes arreglos de aquel de cristales de la misma composición elemental de un compuesto. Los polimorfos usualmente tienen diferentes patrones de difracción de rayos X, espectro infrarrojo, puntos de derretimiento, densidad, dureza, forma cristalina, propiedades ópticas, propiedades eléctricas, estabilidad y solubilidad. Varios factores tales como el solvente de recristalización, la tasa de cristalización y la temperatura de almacenamiento podrían hacer que una sola forma de cristal predomine.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS ESQUEMAS

**[0082]** Las nuevas características del invento se establecen específicamente en las declaraciones adjuntas. Un mejor entendimiento de las características y de las ventajas de este invento se obtendrán por referencia a la siguiente descripción detallada que establece secciones ilustrativas, en las cuales los principios del invento son utilizados, y los esquemas acompañantes de los cuales:

La figura 1 es una representación esquemática de la relación de ciertos aspectos de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas aquí descritas.

La figura 1a presenta varias técnicas de detección de proteínas.

La figura 2 presenta un ejemplo ilustrativo, no limitante de reacciones donde la funcionalidad (A), de un aminoácido, capacidad de traducción incorporada (o incorporada de otra forma) a un polipéptido, reacciona con el reactivo (B) para producir un polipéptido modificado.

La figura 3 presenta un ejemplo ilustrativo, no limitante de una formación de componentes de aminoácidos no naturales que contienen oximas por medio de reacción de componentes de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo con reactivos que contienen hidroxilamina.

La figura 4 presenta un ejemplo ilustrativo no limitante de la formación de componentes de aminoácidos no naturales que contienen oximas por medio de la reacción de componentes de aminoácidos no naturales que contienen hidroxilaminas con reactivos que contienen carbonilo.

- 5 La figura 5 presenta un ejemplo ilustrativo no limitante de la formación de componentes de aminoácidos no naturales que contienen oximas por medio de componentes de aminoácidos no naturales que contienen oximas con reactivos y contienen carbonilo.
- La figura 6 en un ejemplo ilustrativo no limitante de la formación de componentes de aminoácidos no naturales que contienen oximas por medio de reacciones de componentes de aminoácidos no naturales que contienen dicarbonilos con reactivos que contienen hidroxilaminas.
- 10 La figura 7 presenta un ejemplo ilustrativo no limitante de la formación de componentes de aminoácidos no naturales que contienen oximas por medio de reacciones de componentes de aminoácidos no naturales que contienen hidroxilaminas con reactivos que contienen dicarbonilos.
- 15 La figura 8 presenta un ejemplo ilustrativo no limitante de la formación de componentes de aminoácidos no naturales que contienen oximas por medio de reacciones de intercambio de componente es de aminoácidos no naturales que contienen oximas con reactivos que contienen carbonilo o dicarbonilo.
- 20 La figura 9 presenta ejemplos no limitantes de moléculas que están adheridas específicamente en lugares de proteínas por medio de la formación de oximas entre carbonilos de aminoácidos no naturales incorporados a un polipéptido y la hidroxilamina de la molécula.
- La figura 10 muestra un ejemplo de un método de purificación para un polipéptido de aminoácidos no naturales utilizando una resina que reacciona con el aminoácido no natural.
- 25 La figura 11 muestra un ejemplo de un método en el cual la purificación de un polipéptido de aminoácidos no naturales y la conjugación del polipéptido es realizada en "un tarro".
- La figura 12 muestra un ejemplo de una selección y funcionalización de resina.
- 30 La figura 13 muestra un ejemplo de purificación de afinidad de un polipéptido de aminoácidos no naturales usando resina de hidroxilaminas.
- La figura 14 muestra un ejemplo de purificación de un polipéptido de aminoácidos no naturales utilizando una resina de aldehídos.
- 35 La figura 15 muestra un ejemplo de purificación de proteínas nativas de un precursor de aminoácidos no naturales que es convertido por tirosina después de la división.
- 40 La figura 16 muestra ejemplos no limitantes de aminoácidos no naturales
- La figura 17 muestra el análisis SDS-PAGE de conjugaciones de ADN de hebras de un solo hGH 1) mezcla de reacción de la reacción de conjugación; 2) conjugación de hGH - ssADN purificado por medio de una columna HIC.
- 45 La figura 18 muestra una hibridación de una conjugación proteína - ssADN.
- La figura 19 muestra un análisis con gel glicina en un 14% nativo de una hibridación de una conjugación hGH - ssADN: conjugación hGH - ssADN (5 microlitros) con: 1) 0 µl; 2) 2 ml; 3) 4 ml; 4) 6 ml; 5) 8 ml; 6) 10 ml, de 1 mM FTam28d3; y 7) 2 ml; 8) 4 ml; 9) 8 ml, de 10 mM de FTam28-d3.
- 50 La figura 20 muestra un análisis de gel nativo de 5 microlitros de hGH - ssADN mezclado con 1) 0 ml; 2) 1 ml; 3) 4 ml, de 100 mM FTam28-d3; y hGH mezclado con 4) 1 ml; 5) 0 ml, de 100 mM FTam28-d3.
- 55 La figura 21 muestra ensamblajes de estructuras 1-D hGH usando ADN como una plantilla.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

### I. *Introducción*

- 60 **[0083]** Recientemente, una tecnología completamente nueva en las ciencias proteínicas ha sido reportada, que promete superar muchas de las limitaciones asociadas con las modificaciones en lugares específicos de las proteínas. Específicamente, nuevos componentes han sido agregados a la maquinaria biosintética proteínica de la *Escherichia coli* procarionota (*E. coli*) (por ejemplo, L. Wang, et al., (2001), *Science (Ciencia)* 292:498-500) y de la *Sacchomyces cerevisiae* eucariota (*S. cerevisiae*) (por ejemplo, J. Chin et al., *Science (Ciencia)* 301:964-7 (2003)),
- 65 que ha permitido la incorporación de aminoácidos no naturales a proteínas in vivo. Varios aminoácidos con nuevas

propiedades químicas, físicas o biológicas, incluyendo aminoácidos, ceto aminoácidos y aminoácidos glicosilados de clasificaciones de fotoafinidad y photoisomerizables han sido incorporados eficientemente y con un alto nivel de fidelidad a las proteínas en *E. coli* y levaduras en respuesta al codón ámbar (amber), TAG, usando esta metodología. Refiérase a, por ejemplo, J. W. Chin et al., (2002), *Journal of the American Chemical Society* (Revista de la Sociedad Química Americana) 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), *ChemBioChem* 3(11):1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), *PNAS Estados Unidos de América* 99:11020-11024; y, L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1:1-11. Estas investigaciones han demostrado que es posible el introducir selectivamente y rutinariamente grupos funcionales químicos que no se encuentran en las proteínas, que son químicamente inertes a todos los grupos funcionales encontrados en los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente y que podrían usarse para reaccionar eficientemente y selectivamente para formar enlaces covalentes estables.

## II. *Visión general*

[0084] La figura 1 es una visión general de las composiciones, métodos y técnicas que están aquí descritos. En un nivel, provenientes de las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068 son herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y usar un polipéptido que contiene por lo menos un aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado. Aquellos polipéptidos de aminoácidos no naturales pueden contener funcionalidades adicionales, incluyendo, pero sin limitarse a, una marcación; una coloración; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de glicol polietileno; un foto reticulante; un compuesto citotóxico; un medicamento; una etiqueta de afinidad, una etiqueta de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato útil, un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido anti - sentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un ácido ribonucleico inhibitorio; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene un metal; una fracción radioactiva; un grupo funcional nuevo; un grupo que interactúa de forma covalente o no covalente con otras moléculas; una fracción equipada con fotocage; una fracción excitable de radiación actínica; una fracción photoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar enlazado a carbono; un agente redox - activo; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en 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 punto cuántico; un transmisor nano; y cualquier combinación de los anteriores.

[0085] Tal como se muestra en la figura 1, en un aspecto se encuentran los métodos para seleccionar y designar un polipéptido que va a ser modificado utilizando los métodos, composiciones y técnicas descritos en mayor detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068. El nuevo polipéptido puede ser diseñado nuevamente, incluyendo en forma de ejemplo únicamente, como parte de un proceso de examinación de alto caudal (en cuyo caso muchos polipéptidos pueden ser diseñados, sintetizados, caracterizados y / o probados) o basándose en los intereses del investigador. El nuevo polipéptido también puede estar diseñado en base a la estructura de un polipéptido conocido o parcialmente caracterizado. En forma de ejemplo, exclusivamente, la súper familia genética de hormonas de crecimiento (refiérase más adelante) ha sido sujeta de una investigación intensa por parte de la comunidad científica; un nuevo polipéptido puede diseñarse en base a la estructura de un miembro o miembros de esta súper familia genética. Los principios para seleccionar que aminoácidos sustituir y / o modificar se describen por separado en este documento. La elección de qué modificación implementar también se describe aquí, y puede ser utilizada para satisfacer la necesidad del experimentador o del usuario final. Las modificaciones incluyen, sólo en forma de ejemplo, la manipulación de la efectividad terapéutica del polipéptido, mejorando el perfil de seguridad del polipéptido, ajustando la farmacocinética del polipéptido, suministrando funcionalidades adicionales al polipéptido, incorporando una etiqueta, etiquetando o señalizando en una forma detectable al interior del polipéptido, facilitando las propiedades de aislamiento del polipéptido, y cualquier combinación de las modificaciones antes mencionadas.

[0086] Por lo tanto, los polipéptidos que contienen por lo menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado son indicados y descritos en mayor detalle en las aplicaciones de patente de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068. Una amplia variedad de aminoácidos codificados no naturalmente son adecuados para su utilización en este invento. Cualquier número de aminoácidos codificados no naturalmente pueden ser introducidos a un polipéptido. En general, los aminoácidos codificados no naturalmente son sustancialmente y químicamente inertes en relación a los 20 aminoácidos codificados genéticamente comunes (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina). En algunas secciones, los aminoácidos codificados no naturalmente que incluyen grupos funcionales de la cadena lateral que reaccionan eficientemente y selectivamente con grupos funcionales que no se encuentran en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero sin limitarse a, grupos azido, cetona, aldehído y aminooxi) para formar conjugaciones estables. Puesto que los aminoácidos codificados no naturalmente del invento típicamente difieren de los aminoácidos naturales sólo en la estructura de la cadena lateral, los aminoácidos



codificados no naturalmente forman enlaces de amidas con otros aminoácidos, incluyendo pero sin limitarse a, aquellos codificados natural o no naturalmente, en la misma forma en la cual ellos están formados en polipéptidos que ocurren naturalmente. Sin embargo, los aminoácidos codificados no naturalmente tienen grupos de cadenas laterales que los distinguen de los aminoácidos naturales. Por ejemplo, la cadena lateral (grupo R) opcionalmente contiene un grupo alquilo, arilo, acilo, ceto, azido, hidroxilo, hidracina, ciano-, halo-, hidracida, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, seleno-, sulfonilo, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterociclo, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina, amino o similares o cualquiera de sus combinaciones.

**[0087]** Otros aminoácidos que ocurren no naturalmente de interés que pueden ser apropiados para su uso en este invento incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos que contienen enlaces transversales fotoactivables, aminoácidos con etiquetas de rotación, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos de enlaces con metales, aminoácidos que contienen metales, aminoácidos radiactivos, aminoácidos con grupos nuevos funcionales, aminoácidos que interactúan en una forma covalente o no covalente con otras moléculas, aminoácidos con funcionalidad fotocage y / o fotoisomerizables, aminoácidos que contienen biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glicosilados tales como una serina con azúcar sustituida, otros aminoácidos de carbohidratos modificados, aminoácidos que contienen ceto, aminoácidos que contienen glicol polietileno o polieter, aminoácidos con átomos pesados sustituidos, aminoácidos químicamente divisibles y / o foto divisibles, aminoácidos con cadenas laterales alargadas en comparación a los aminoácidos naturales, incluyendo pero sin limitarse a, poliéteres o hidrocarburos de cadenas largas, incluyendo, pero sin limitarse a, superiores que alrededor de cinco o superiores que alrededor de 10 carbonos, aminoácidos que contienen azúcar vinculados a carbonos, aminoácidos con actividad redox, aminoácidos que contienen tioácido amino, y aminoácidos que contienen una o más fracciones tóxicas.

**[0088]** Varios aminoácidos no naturales para su incorporación en polipéptidos se pueden encontrar en WO 2002/085923 con el título "In vivo incorporation of unnatural amino acids" ("incorporación in vivo de aminoácidos no naturales"). Métodos y composiciones para la incorporación in vivo de aminoácidos codificados no naturalmente se describen en la publicación de la aplicación de patente de Estados Unidos 2003/0082575. Métodos para seleccionar una pareja de sintetasa TRNA - TRNA ortogonal para su uso en un sistema de traducción in vivo en un organismo también se describen en las publicaciones de las aplicaciones de patentes de Estados Unidos 2003/0082575 y 2003/0108885. La publicación PCT número WO 04/035743 titulada "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins" ("Incorporación en Lugares Específicos de Aminoácidos Ceto en Proteínas"), describe parejas RS y TRNA ortogonales para la incorporación de aminoácidos ceto. La publicación PCT número WO 04/094593 titulada "Expanding the Eukaryotic Genetic Code" ("Expandiendo el Código Genético Eucariota", describe parejas RS y TRNA ortogonales para la incorporación de aminoácidos codificados no naturalmente en las células anfitrionas eucariotas. Aminoácidos codificados no naturalmente tienen grupos de cadenas laterales que los distinguen de los aminoácidos naturales. La cadena lateral puede incluir un alquilo, arilo, acilo, ceto, azido, hidroxilo, hidracina, ciano-, halo-, hidracida, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, seleno-, sulfonilo, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterociclo, enona, imina, aldehído, éster,, hidroxilamina, grupo tioácido amino, o similares, o cualquiera de sus combinaciones.

**[0089]** En ciertas secciones, los polipéptidos con por lo menos un aminoácido no natural o grupo de aminoácidos no naturales modificados incluyen por lo menos una modificación post - traducción en alguna posición en el polipéptido. En algunas secciones la modificación post - traducción ocurren por medio de la maquinaria celular (por ejemplo, glicosilación, acetilación, acilación, lipidmodificación, palmitoilación, adición de palmitatos, fosforilación, modificación de la vinculación de glicolípidos, y similares). En muchas instancias, aquellas modificaciones post - traducción que se basan en maquinaria celular ocurren en lugares de aminoácidos que ocurren naturalmente en el polipéptido, sin embargo, en ciertas secciones, las modificaciones post - traducción que se basan en la maquinaria celular ocurren en el lugar o los lugares de aminoácidos que no ocurren naturalmente en el polipéptido.

**[0090]** En otras secciones la modificación post - traducción no utiliza la maquinaria celular, pero en vez de eso se suministra por la adherencia de una molécula (incluyendo, pero sin limitarse a, una marcación, una coloración; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de glicol polietileno; un foto reticulante; un compuesto citotóxico; un medicamento, una marcación de afinidad, una etiqueta de foto afinidad; un compuesto reactivo; una resina; una proteína o polipéptido o análogo de polipéptido secundario; un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un ácido ribonucleico inhibitorio; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene un metal; una fracción radioactiva; un nuevo grupo funcional; un grupo que interactúa de forma covalente o no covalente con otras moléculas; una fracción fotocaged; una fracción excitable de radiación actínica; una fracción fotoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar enlazado a carbono; un agente redox -activo; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en 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 punto cuántico; un transmisor nano; y cualquier combinación de los anteriores) que contenga un segundo grupo reactivo a por lo menos un aminoácido no natural que contenga un primer grupo reactivo (incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos no naturales que contengan un grupo funcional

de cetonas, aldehídos, acetal, hemiacetal, oxima, o hidroxilamina) utilizando metodología química que es conocida para una persona con conocimiento ordinario en la industria para que sea apropiada para los grupos reactivos específicos. En ciertas secciones, las modificaciones post - traducción son hechas in vivo en una célula eucariota o en una célula no eucariota. En ciertas secciones, la modificación post - traducción es hecha in vitro. También se presentan métodos para producir, purificar, caracterizar y usar aquellos polipéptidos que contienen por lo menos un aminoácido no natural modificado después de su traducción.

**[0091]** También se encuentran incluidos dentro del alcance de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas y se encuentran explicados en mayor detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068 son reactivos capaces de reaccionar con un aminoácido no natural que es parte de un polipéptido para producir cualquiera de las modificaciones post - traducción ya mencionadas. En general, el aminoácido no natural modificado post - traducción contendrá por lo menos un aminoácido no natural que experimentará reacciones subsecuentes de modificación. También se incluye en este aspecto otros métodos para producir, purificar, caracterizar y utilizar aquellos reactivos que son capaces de cualquiera de aquellas modificaciones post - traducción de aquellos aminoácidos no naturales.

**[0092]** En ciertas secciones, la proteína incluyen por lo menos una modificación post - traducción que es hecha in vivo por una célula anfitriona, donde la modificación post - traducción no es hecha normalmente por otro tipo de célula anfitriona. En ciertas secciones, la proteína contiene por lo menos una modificación post - traducción que es hecha in vivo por una célula eucariota, donde la modificación post - traducción no es hecha normalmente por una célula no eucariota. Ejemplos de modificaciones post - traducción incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitatos, fosforilación, modificación de vinculación de glicolípidos, y similares. En una sección, la modificación post - traducción comprende la adherencia de un oligosacárido a una asparagina por medio de una vinculación GlcNAc - asparagina (incluyendo, pero sin limitarse a, cuando el oligosacárido comprende (GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAc, y similares). En otra sección, la modificación post - traducción incluye adherencia de un oligosacárido (incluyendo, pero sin limitarse a, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina por medio de un enlace GalNAc - serina, GalNAc - treonina, GlcNAc -serina, o GlcNAc - treonina. En ciertas secciones, una proteína o polipéptido puede comprender una secuencia de secreción o localización, un marcador de epítope, un marcador FLAG, un marcador de polihistidina, una fusión GST, y / o similares. Ejemplos de secuencias de señalización de secreción incluyen, pero no se limitan a, una secuencia de señalización de secreción procariota, una secuencia de señalización de secreción eucariota, una secuencia de señalización de secreción eucariota 5' optimizada para expresión bacteriana, una secuencia nueva de señalización de secreción, una secuencia de señalización de secreción de liasa de pectato, secuencia de señalización de secreción de *Omp A*, y una secuencia de señalización de secreción de fago. Ejemplos de secuencias de señalización de secreción, incluyen, pero no se limitan a, STII (procariota), Fd GIII y M13 (fago), Bg12 (levadura), y la secuencia de señalización bla derivada de transposón. También se presentan métodos para producir, purificar, caracterizar y usar aquellos polipéptidos que contienen por lo menos una de esas modificaciones post - traducción.

**[0093]** La proteína o polipéptido de interés puede contener por lo menos 1, o lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, o lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, o lo menos 8, por lo menos 9, o 10 o más aminoácidos no naturales. Los aminoácidos no naturales pueden ser los mismos o diferentes, por ejemplo, pueden existir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios diferentes en la proteína que contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos diferentes no naturales. En ciertas secciones, por lo menos un pero menos que todos, de un aminoácido particular presente en una versión que ocurre naturalmente de la proteína que es sustituida con un aminoácido no natural.

**[0094]** Los métodos y composiciones suministrados y descritos en esta presentación incluyen polipéptidos que contienen por lo menos un aminoácido no natural. La introducción de por lo menos un aminoácido no natural en un polipéptido puede permitir para la aplicación de químicas de conjugación que involucran reacciones químicas específicas, incluyendo, pero sin limitarse a, con uno o más aminoácidos no naturales mientras no reaccionan con los 20 aminoácidos que ocurren comúnmente. Una vez incorporadas, las cadenas laterales de aminoácidos pueden ser modificadas al utilizar metodologías químicas conocidas en la industria para que sean apropiadas para los grupos finales específicos o sustituyentes presentes en el aminoácido codificado naturalmente.

**[0095]** Los métodos y composiciones de aminoácidos no naturales aquí descritas suministra conjugaciones de sustancias que tienen una amplia variedad de grupos funcionales, sustituyentes o fracciones, con otras sustancias incluyendo, pero sin limitarse a, un marcador, una coloración, un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado de glicol polietileno, un foto reticulador; un compuesto citotóxico; un medicamento; un marcador de afinidad; un marcador de foto afinidad; un compuesto reactivo; una resina; una proteína o polipéptido o análogo de polipéptido secundaria; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido anti - sentido; un sacárido ;, un dendrímero soluble en agua; una ciclodextrina; un ácido ribonucleico inhibitorio; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene un metal; una fracción radiactiva; un grupo funcional nuevo; un grupo que interactúa de forma covalente o no covalente con otras moléculas; una fracción photocaged; una fracción de radiación excitable actínica; una fracción fotoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina;

una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar enlazado a un carbono; un agente redox - activo; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en 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 punto cuántico; un transmisor nano; y cualquiera de sus combinaciones. La conjugación de un polipéptido de aminoácidos naturales con una molécula, incluyendo, pero sin limitarse a, biotina puede permitir la purificación de la conjugación.

5  
10 **[0096]** En otro aspecto de las composiciones, métodos, técnicas y estrategias se describen en más detalle en las aplicaciones de patente de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068 métodos para estudiar o usar cualquiera de los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) ya mencionados. Incluido en esta sección, en forma de ejemplos solamente, existen usos terapéuticos, de diagnóstico, que se basan en ensayos, industriales, cosméticos, de biología vegetal, medioambientales, de energía y / o militares que se beneficiarían de un polipéptido que contenga polipéptidos o proteínas con aminoácidos no naturales (modificados).

15  
20 **[0097]** En este documento existe un método para detectar los polipéptidos con aminoácidos naturales (modificados) ya mencionados o uno de sus fragmento. Aquellos polipéptidos con aminoácidos no naturales o uno de sus fragmentos pueden obtenerse al combinar los polipéptidos con aminoácidos naturales o sus fragmentos con una biblioteca de moléculas bajo condiciones a apropiadas para permitir interacciones específicas. También se presenta en este documento un método para detectar los polipéptidos con aminoácidos no naturales (modificados) ya mencionados o sus fragmentos donde los polipéptidos con aminoácidos no naturales o uno de sus fragmentos han sido obtenidos al combinar los polipéptidos con aminoácidos no naturales o uno de sus fragmentos con la biblioteca de proteínas o una de sus porciones bajo condiciones adecuadas para pedir la interacción específica. Aquellas interacciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, acilación, fosforilación, desfosforilación, ubiquitinación, glicosilación, modificación de lípidos, ribosilación ADP, biodisponibilidad y vida media. Aquellas bibliotecas incluyen alfa-1 antitripsina, angiotatina, factor de antihemolítica, anticuerpo, apolipoproteína, apoproteína, factor natriurético atrial, polipéptido natriurético atrial, péptido atrial, quimiocinas CXC, 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, quimioquina CC, proteína quimioatrayente de monocitos -1, proteína quimiotáctica de monocitos-2, proteína quimiotáctica de monocitos -3, proteína inflamatoria de monocitos -1 alfa, proteína inflamatoria de monocitos beta- i, RANTES, 1309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262, CD40, ligando CD40, ligando c-kit, colágeno, factor estimulante de colonias (CSF - colony stimulating factor), el factor de complemento 5a, inhibidor de complemento, receptor de complemento 1, citoquina, péptido activador de neutrófilos epiteliales-78 , MIP-16, MCP-1, factor de crecimiento epidérmico (EGF - epidermal growth factor), péptido de activación de neutrófilos epiteliales, la eritropoyetina (EPO), toxina exfoliante, Factor IX, Factor VII, Factor VIII, Factor X, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF - fibroblast growth factor), fibrinógeno, fibronectina, proteína de paquete de cuatro hélices, G-CSF, glp-1, GM-CSF, glucocerebrosidasa, gonadotropina, factor de crecimiento, receptor del factor de crecimiento, grf, proteína hedgehog (erizo), hemoglobina, factor de crecimiento de hepatocitos (hGF - hepatocyte growth factor), hirudina, hormona de crecimiento humana (hGH - human growth hormone), seroalbúmina humana, ICAM-1, receptor ICAM-1, LFA-1, receptor LFA-1, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF - insulin-like growth factor), IGF-I, IGF-II, interferón (IFN), IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, 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 - keratinocyte growth factor), lanreotida, lactoferrina, factor inhibitorio de leucemia, luciferasa, neuturina, factor inhibidor de neutrófilos (NIF - neutrophil inhibitory factor), oncostatina M, proteína osteogénica, producto oncogénico, paracitonina, hormona paratiroidea, PD-ECSF, PDGF, hormona peptídica, pleyotropina, proteína A, proteína G, pth, exotoxina pirogénica A, exotoxina pirogénica B, exotoxina pirogénica C, PYY, relaxina, renina, SCF, proteína pequeña biosintética, receptor del complemento soluble I, soluble I-CAM 1, los receptores de la interleucina soluble, receptor de TNF soluble, somatomedina, somatostatina, somatotropina, estreptoquinasa, superantígenos, enterotoxina estafilocócica, SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, receptor de hormonas esteroideas, superóxido de dismutasa, toxina del síndrome de choque tóxico, timosina alfa 1, activador del plasminógeno de tejidos, factor de crecimiento tumoral (TGF - tumor growth factor), factor de necrosis tumoral, factor de necrosis tumoral alfa, factor de necrosis tumoral beta, receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR - tumor necrosis factor receptor), proteína VLA-4, proteína VCAM-1, factor de crecimiento endotelial vascular urotensina-II (VEGF - vascular endothelial growth factor), 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.

### 60 **III. Ubicación de aminoácidos no naturales en los polipéptidos**

65 **[0098]** Los poli péptidos o sus fragmentos de aminoácidos no naturales aquí presentados, incluyen la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en un polipéptido. Uno o más aminoácidos no naturales pueden ser incorporados en una posición específica que no interrumpa la actividad del polipéptido. Esto puede lograrse al hacer sustituciones "conservadoras", incluyendo, pero sin limitarse a, la sustitución de aminoácidos hidrofóbicos con aminoácidos hidrofóbicos, aminoácidos voluminosos por aminoácidos voluminosos, aminoácidos hidrofílicos por

aminoácidos hidrofílicos y / o insertando el aminoácido no natural en una ubicación que no es requerida para la actividad.

5 **[0099]** Una variedad de métodos bioquímicos y estructurales pueden utilizarse para seleccionar los lugares  
deseados para la sustitución con un aminoácido no natural dentro del polipéptido. Cualquier posición de la cadena  
del polipéptido es adecuado para la selección para incorporar un aminoácido no natural, y la selección podría  
basarse en un diseño racional o por selección aleatoria para cualquier propósito deseado específico o no específico.  
10 La selección de lugares deseados podría darse para producir un polipéptido de aminoácidos no naturales (que  
podría ser modificado o permanecer no modificado) que tenga una propiedad o actividad deseada, incluyendo, pero  
sin limitarse a, agonistas, súper agonistas, agonistas inversos, antagonistas, moduladores vincula dores de  
receptores, moduladores de las actividades de receptores, moduladores de la vinculación a uno o más compañeros  
15 de enlaces, moduladores de la actividad de los compañeros de enlaces, moduladores de la conformación de los  
compañeros de enlaces, formación de dímeros, formación de multímeros, ningún cambio de actividad o propiedad  
en comparación con la molécula nativa, o la manipulación de cualquier propiedad física o química del polipéptido tal  
como solubilidad, agregación o estabilidad. Por ejemplo, ubicaciones en el polipéptido requeridas para actividades  
biológicas de un polipéptido pueden identificarse usando un análisis de mutación de puntos, detección de alanina o  
20 detección de homólogos, métodos que son conocidos en la industria. Métodos similares a aquellos descritos en  
Cunningham, B. y Wells, J., Science (Ciencia), 244:1081-1085 (1989) y Cunningham, B., et al. Science (Ciencia)  
243: 1330-1336 (1989) pueden ser utilizados para identificar residuos que son críticos para la bioactividad y / o  
pueden ser utilizados para identificar epítopes de anticuerpos y receptores. Las patentes de Estados Unidos  
números 5,580,723; 5,834,250; 6,013,478; 6,428,954; y 6,451,561, describen métodos para un análisis sistemático  
25 de la estructura y de la función de los polipéptidos al identificar dominios activos que influyen en la actividad del  
polipéptido con una sustancia objetiva. Residuos que no son los que han sido identificados como críticos para la  
actividad biológica por la mutagénesis por medio de la detección de alanina o de homólogos pueden ser buenos  
candidatos para ser sustituidos con un aminoácido no natural dependiendo de la actividad deseada que se busca  
para el polipéptido. Alternamente, los sitios identificados como críticos para la actividad biológica también pueden ser  
30 buenos candidatos para la sustitución con un aminoácido no natural, nuevamente dependiendo de la actividad  
deseada que se busca para el polipéptido. Otra alternativa sería simplemente hacer sustituciones seriales en cada  
posición en la cadena del polipéptido con un aminoácido no natural y observar el efecto en las actividades de los poli-  
péptidos. Ya es aparente para aquellas personas con conocimiento ordinario en la industria que cualquier forma,  
técnica o método para seleccionar una posición para sustitución con un aminoácido no natural en cualquier  
polipéptido es adecuado para su uso en este invento.

35 **[0100]** La estructura y actividad de mutaciones que ocurren naturalmente de un polipéptido que contiene  
eliminaciones también puede examinarse para determinar regiones de la proteína que tienen posibilidad de ser  
tolerantes a la sustitución con un aminoácido no natural. Una vez que los residuos tienen la posibilidad de no ser  
tolerantes para una sustitución con aminoácidos no naturales con aminoácidos no naturales que han sido  
eliminados, el impacto de las sustituciones por estas en cada una de las posiciones puede examinarse desde la  
40 estructura tridimensional del polipéptido relevante, y cualquier ligando asociado o proteína de vinculación. Rayos  
equis cristalográficos y estructuras NMR de muchos polipéptidos están disponibles en el Banco de Datos Proteínicos  
(PDB - Protein Data Bank, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), una base de datos centralizada que contiene datos estructurales  
tridimensionales de moléculas largas de proteínas y ácidos nucleicos. Por lo tanto, aquellas personas con  
conocimiento ordinario en la industria pueden identificar fácilmente las posiciones de aminoácidos que pueden ser  
45 sustituidas con aminoácidos no naturales.

**[0101]** Ejemplos de lugares de incorporación de aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a, aquellos  
que son excluidos de las regiones potenciales de vinculación de receptores, regiones para la vinculación de uno o  
más compañeros de enlace, podrían estar expuestos completamente o parcialmente a solventes, no tener  
interacciones de enlaces de hidrógeno o tener interacciones mínimas con los residuos cercanos, podrían estar  
50 mínimamente expuestos a los residuos de reactivos cercanos, podrían estar en uno o más de las caras expuestas  
del polipéptido, podrían estar en regiones que son altamente flexibles o estructuralmente rígidas tal como lo  
pronosticaría la estructura tridimensional, secundaria, terciaria o cuaternaria del polipéptido, vinculado o no vinculado  
a su receptor asociado, ligando o proteínas vinculantes, o acoplado o no acoplado a otro péptido u otra molécula  
biológicamente activa, o podría modular la conformación del polipéptido en sí o un dímero o multímero que conforma  
55 a uno o más polipéptidos al alterar la flexibilidad o rigidez de toda la estructura tal como sea deseado.

**[0102]** Una amplia gama de aminoácidos no naturales pueden ser sustituidos por, o incorporados a, cualquier  
posición en un polipéptido. En general, un aminoácido en particular no natural puede seleccionarse para su  
incorporación basándose en una examinación de la estructura cristalina tridimensional del polipéptido con su ligando,  
60 receptor y / o proteínas de vinculación asociadas, de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, una  
preferencia para sustituciones conservadoras (es decir, aminoácidos no naturales que se basan en el anillo, tal como  
p-acetilfenilalanina o O-propargiltirosina sustituyéndose por Phe, Tyr o Trp), y la química de conjugación específica  
que uno desee introducir en la proteína del polipéptido.

5 [0103] El método también incluye la incorporación a la proteína del aminoácido no natural, donde el aminoácido no natural contiene un grupo reactivo primario; y comprende el contactar la proteína con una molécula (incluyendo, pero sin limitarse a, un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de glicol de polietileno; un fotoreticulante; un compuesto citotóxico; una medicina; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido; un dendrímero soluble en agua; una ciclodextrina; un ácido ribonucleico inhibitorio; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene un metal; una fracción radiactiva; un grupo funcional nuevo; un grupo que interactúa de forma covalente o no covalente con otras moléculas; una fracción photocaged; una fracción excitable de radiación actínica; una fracción fotoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina; una fracción que conforma un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar enlazado a carbono; un agente redox - activo; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en 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 punto cuántico; un transmisor nano; y cualquiera de sus combinaciones) que comprende un segundo grupo reactivo.

20 [0104] En algunos casos, las sustituciones o incorporaciones de aminoácidos no naturales serán combinadas con otras adiciones, sustituciones o eliminaciones dentro del polipéptido para afectar a otras características biológicas. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones podrían incrementar la estabilidad (incluyendo, pero sin limitarse a, la resistencia a la degradación proteolítica) del polipéptido o un incremento en afinidad del polipéptido para su receptor, ligando y / o proteínas de vinculación apropiadas en algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones podrían incrementar la solubilidad (incluyendo, pero sin limitarse a, cuando se expresa en *E. coli* u otras células anfitrionas) del polipéptido. En algunos casos, los lugares son seleccionados para la sustitución con un aminoácido codificado naturalmente o no natural además a otro lugar de incorporación de un aminoácido no natural con el propósito de incrementar dar la solubilidad del polipéptido siguiendo la expresión en las células anfitrionas recombinantes de *E. coli*. En algunos casos, los polipéptidos comprenden otra adición, sustitución o eliminación que modula la afinidad para el ligando asociado, proteínas de vinculación y/o receptores, modula (incluyendo, pero sin limitarse a, incrementos o reducciones) la dimerización del receptor, estabiliza los dímeros receptores, modula la vida media circulante, modula la liberación o biodisponibilidad, facilita la purificación o mejora o altera una ruta particular de administración. Similarmente, el polipéptido puede incluir secuencias de división química o enzimática, secuencias de división de proteasas, grupos reactivos, dominios de vinculación de anticuerpos (incluyendo, pero sin limitarse a, FLAG o poli-HIs, GST, etc.) o moléculas vinculadas (incluyendo, pero sin limitarse a, biotina) que mejora la detección (incluyendo, pero sin limitarse a, GFP), purificación, transporte por medio de tejidos o membranas celulares, la liberación o activación de pro-medicamentos, reducción de tamaño u otras características del polipéptido.

#### 40 IV. *La familia súper genética de hormonas de crecimiento como ejemplo*

45 [0105] Los métodos, composiciones, estrategias y técnicas aquí descritos no se limitan a un tipo, clase o familia específica de polipéptidos o proteínas. Solo como un ejemplo, el polipéptido puede ser homólogo a una proteína terapéutica seleccionada de un grupo que consiste de: antitripsina alfa-1, angiostatina, factor antihemolítico, anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, apolipoproteína, apoproteína, factor natriurético atrial, polipéptido natriurético atrial, péptido atrial, quimioquina CXC, 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, quimioquina CC, proteína quimioatrayente de monocitos -1, proteína quimiotáctica de monocitos-2, proteína quimioatrayente de monocitos -3, proteína inflamatoria de monocitos -1 alfa, proteína inflamatoria de monocitos- beta i, RANTES, 1309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262, CD40, ligando CD40, ligando c-kit, colágeno, factor estimulante de colonias (CSF - colony stimulating factor), factor del complemento 5a, inhibidor del complemento, receptor del complemento 1, citoquina, péptido activador de neutrófilos epiteliales-78, MIP-16, MCP-1, factor de crecimiento epidérmico (EGF - epidermal growth factor), péptido activador de neutrófilos epiteliales, eritropoyetina (EPO), toxina exfoliante, Factor IX, Factor VII, Factor VIII, Factor X, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF - fibroblast growth factor), fibrinógeno, fibronectina, paquete de proteínas de cuatro hélices, G-CSF, glp-1, GM-CSF, glucocerebrosidasa, gonadotropina, factor de crecimiento, receptor del factor de crecimiento, grf, proteína hedgehog, hemoglobina, factor de crecimiento de hepatocitos (hGF - hepatocyte growth factor), hirudina, hormona de crecimiento humana (hGH - human growth hormone), seroalbúmina humana, ICAM-1, receptor ICAM-1, LFA-1, receptor LFA-1, insulina, factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF - insulin-like growth factor), IGF-I, IGF-II, interferón (IFN), IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, 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 - keratinocyte growth factor), lactoferrina, factor inhibidor de leucemia, luciferasa, neurturina, factor inhibidor de neutrófilos (NIF - neutrophil inhibitory factor), oncostatina M, proteína osteogénica, producto de oncogenes, paracitonin, hormona paratiroidea, PD-ECSF, PDGF, hormona peptídica, pleyotropina, proteína A, proteína G, pth, exotoxina pirogénica A, exotoxina pirogénica B, exotoxina pirogénica C, PYY, relaxina, renina, SCF, proteína biosintética pequeña, receptor del complemento soluble I, I-CAM soluble 1, receptor soluble de la interleucina, receptor soluble de TNF, somatomedina, somatostatina, somatotropina, estreptoquinasa, superantígenos, enterotoxina estafilocócica, SEA,

SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, receptor de esteroides hormonales, superóxido dismutasa, toxina del síndrome de shock tóxico, timosina alfa 1, activador del plasminógeno tisular, factor de crecimiento tumoral (TGF - tumor growth factor), factor de necrosis tumoral, factor de necrosis tumoral alfa, factor de necrosis tumoral beta, receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR - tumor necrosis factor receptor), proteína VLA-4, proteína VCAM-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF - vascular endothelial growth factor), uroquinasa, mos, ras, raf, se reunió, p53, tat, fos, myc, jun, myb, rel, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, receptor de testosterona, receptor de aldosterona, receptor de LDL, y corticosterona.

**[0106]** Los fragmentos de anticuerpos aquí presentados incluyen anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de anticuerpos completos, y anticuerpos que han sido diseñados. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fc, Fab, y (Fab')<sub>2</sub>, Fv de cadena sencilla (scFv - single chain Fv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDRs, regiones variables, regiones estructurales, regiones constantes, y similares (Maynard y Georgiou, 2000, Annu Rev. Biomed Eng 2:... 339-76; Hudson, 1998, Curr Opin Biotechnol 9: 395-402). Otra subestructura funcional es el Fv de cadena sencilla (scFv - single chain Fv), conformado de regiones variables de la inmunoglobulina de cadenas pesadas y ligeras, conectada covalentemente por un vinculador de péptidos (S-z Hu et al., 1996, Cancer Research (investigación del cáncer), 56, 3055-3061). Estas pequeñas proteínas (Mr 25,000) retiene generalmente la especificidad y afinidad de antígenos en un solo polipéptido y pueden suministrar un bloque estructural conveniente para moléculas anti genes específicas más grandes. Los polipéptidos también pueden incluir la cadena pesada de anticuerpos, la cadena ligera de anticuerpos, la región variable de anticuerpos, moléculas que no son de anticuerpos en un portador alterno y anticuerpos con dos especialidades, así como otros polipéptidos enlazadores de antígenos o sus fragmentos.

**[0107]** Por lo tanto la siguiente descripción de la familia súper genética de hormonas de crecimiento es suministrada para propósitos ilustrativos y sólo como un ejemplo y no establece un límite en el alcance de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas aquí descritas. Además, la referencia a polipéptidos GH en esta aplicación tiene el propósito de utilizar el término genérico como un ejemplo de cualquier miembro de la familia súper genética GH. Por lo tanto, se entiende que las modificaciones y químicas aquí descritas en referencia a los polipéptidos o proteínas GH pueden ser aplicados igualmente a cualquier miembro de la familia súper genética GH, incluyendo aquellos que fueron listados específicamente en este documento.

**[0108]** Las siguientes proteínas incluyen aquellas codificadas por los genes de la familia súper genética de la hormona de crecimiento (GH - growth hormone) (Bazan, F., Immunology Today 11: 350-354 (1990); Bazan, J. F. Science (Ciencia) 257: 410-413 (1992); Mott, H. R. y Campbell, I. D., Current Opinion in Structural Biology 5 "Opinión Actual en Biología Estructural 5": 114-121 (1995); Silvennoinen, O. y Ihle, J. N., SIGNALLING BY THE HEMATOPOIETIC CYTOKINE RECEPTORS (SEÑALIZACIÓN POR PARTE DE LOS RECEPTORES DE CITOQUINA HEMATOPOYÉTICA) (1996): la hormona del crecimiento, prolactina, lactógeno placentario, eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), interleucina-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 (subunidad p35), IL-13, IL-15, oncostatina M, factor neurotrófico ciliar, factor inhibidor de leucemia, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón omega, interferón tau, el factor estimulante de colonias de granulocitos-(G-CSF - granulocyte-colony stimulating factor), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF - granulocyte-macrophage colony stimulating factor), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF - macrophage colony stimulating factor) y la cardiotrofina-1 (CT-1) ("la familia de supergenes de GH"). Se anticipa que miembros adicionales de esta familia genética se identifiquen en el futuro por medio de clonaje y secuencia genética. Los miembros de la familia súper genética GH tienen estructuras secundarias y terciarias similares, a pesar de que éstas tienen generalmente una identidad secuencial limitada de aminoácidos o ADN. Las características estructurales compartidas permiten que nuevos miembros de la familia genética sean identificados fácilmente y los métodos y composiciones aquí descritas para aminoácidos no naturales se aplican en forma similar.

**[0109]** Las estructuras de varias citoquinas, incluyendo G-CSF (Zink et al., FEBS Lett. 314:435 (1992); Zink et al., Biochemistry (Bioquímica) 33:8453 (1994); Hill et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:5167 (1993)), GM-CSF (Diederichs, K., et al. Science (Ciencia) 154: 1779-1782 (1991); Walter et al., J. Mol. Biol. 224:1075-1085 (1992)), IL-2 (Bazan, J. F. y McKay, D. B. Science (Ciencia) 257: 410-413 (1992)), IL-4 (Redfield et al., Biochemistry (Bioquímica) 30: 11029-11035 (1991); Powers et al., Science (Ciencia) 256:1673-1677 (1992)), e IL-5 (Milburn et al., Nature (Naturaleza) 363: 172-176 (1993)) han sido determinadas por difracción de rayos X y estudios NMR mostrando una conservación impresionante con la estructura GH, a pesar de una falta de una homología secuencial primaria significativa. IFN es considerado como un miembro de esta familia basándose en modelajes y otros estudios (Lee et al., J. Interferon Cytokine Res. (Res. Citoquina de Interferones) 15:341 (1995); Murgolo et al., Proteins (Proteínas) 17:62 (1993); Radhakrishnan et al., Structure (Estructura) 4:1453 (1996); Klavs et al., J. Mol. Biol. 274:661 (1997)). EPO es considerado como un miembro de esta familia basándose en modelajes e investigaciones de mutagénesis (Boissel et al., J. Biol. Chem. 268: 15983-15993 (1993); Wen et al., J. Biol. Chem. 269: 22839-22846 (1994)). Un gran número de citoquinas y factores de crecimiento adicionales incluyendo factor neurotrófico ciliar (CNTF - ciliary neurotrophic factor), factor inhibidor de la leucemia (LIF - leukemia inhibitory factor), trombopoyetina (TPO), oncostatina M, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF - macrophage colony stimulating factor), IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-13, IL-15, y el factor estimulante de colonias de granulocitos-(G-CSF -

granulocyte-colony stimulating factor), así como los pertenecientes a IFN tales como los interferones alfa, beta, omega, tau, épsilon, y gamma son de esta familia (revisado en Mott y Campbell, Current Opinion in Structural Biology 5 (Opinión Actual en Biología Estructural 5): 114-121 (1995); Silvennoinen e Ihle (1996) SIGNALLING BY THE HEMATOPOIETIC CYTOKINE RECEPTORS (SEÑALIZACIÓN POR PARTE DE LOS RECEPTORES HEMATOPOYÉTICOS DE LA CITOQUINA). Todas las citoquinas y factores de crecimiento que se acaban de mencionar son considerados en este momento como miembros de una gran familia genética.

[0110] además de compartir estructuras secundarias y terciarias similares, los miembros de esta familia comparten la propiedad en la que deben oligomerizar los receptores superficiales celulares para activar los senderos de señalización intracelular. Algunos miembros de la familia GH, incluyendo pero sin limitarse a; GH y EPO, vinculan un solo tipo de receptores y causan que éstos formen homodímeros. Otros miembros familiares, incluyendo, pero sin limitarse a, IL-2, IL4, y IL-6, vinculan más de un tipo de receptores y causan que los receptores formen heterodímeros o agregados de un orden más alto (Davis et al., (1993) Science (Ciencia) 260: 1805-1808; Paonessa et al., 1995) EMBO J. 14: 1942-1951; Mott y Campbell, Current Opinion in Structural Biology 5 (Opinión Actual en Biología Estructural 5): 114-121 (1995)). Estudios de mutagénesis han mostrado que, similarmente que en GH, estas otras citoquinas y factores de crecimiento contienen varios lugares de vinculación de receptores, típicamente dos, y vinculan sus receptores afines secuencialmente (Mott y Campbell, Current Opinion in Structural Biology 5 (Opinión Actual en Biología Estructural 5): 114-121 (1995); Matthews et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 9471-9476). Similarmente que en GH, los lugares primarios de vinculación de receptores para estos otros miembros familiares ocurren principalmente en las cuatro hélices alfa y el circuito A – B. Los aminoácidos específicos en los paquetes helicoidales que participan en la vinculación de receptores difieren entre miembros familiares. La mayoría de receptores superficiales celulares que interactúan con los miembros de la familia súper genética GH están relacionados estructuralmente y comprenden una segunda familia multigenética grande. Refiérase, por ejemplo, a la patente de Estados Unidos número 6,608,183.

[0111] Una conclusión general alcanzada de estudios rotacionales de varios miembros de la familia súper genética GH es que los circuitos que unen a las hélices alfa generalmente tienden a no involucrarse en la vinculación de receptores. En particular, el circuito corto B - C parece no ser esencial para la vinculación de receptores en el caso de la mayoría, sino de todos, los miembros familiares. Por esta razón, el circuito B - C puede ser sustituido con aminoácidos no naturales tal como se describe aquí en los miembros de la familia súper genética GH. El circuito A-B, el circuito C - D (y el circuito D - E del interferón / de los miembros similares a IL – 10 de la súper familia GH) pueden ser sustituidos con un aminoácido no natural. Los aminoácidos cercanos a la hélice A y distales a la hélice final también tienden a no involucrarse en la vinculación de receptores y también pueden ser lugares para introducir los aminoácidos no naturales. En algunas secciones, un aminoácido no natural es sustituido en cualquier posición dentro de la estructura del circuito incluyendo pero sin limitarse a, los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o más aminoácidos del circuito A-B, B-C, C-D o D-E. En algunas secciones, un aminoácido no natural es sustituido con el último 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o más aminoácidos del circuito A-B, B-C, C-D o D-E.

[0112] Ciertos miembros de la familia GH, incluyendo, pero sin limitarse a, EPO, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IFN, GM-CSF, TPO, IL-10, IL-12 p35, IL-13, IL-15 e interferón beta que contiene azúcares vinculados con N y / o vinculados con O. Los lugares de glicosilación en las proteínas ocurren casi exclusivamente en las regiones de circuitos y no en los paquetes helicoidales alfa. Puesto que las regiones generalmente no se involucran en la vinculación de receptores y puesto que son sitios para la adherencia covalente del grupo de azúcares, podrían ser lugares útiles para introducir sustituciones de aminoácidos no naturales a las proteínas. Los aminoácidos que tienen lugares de glicosilación de vinculación con N y O en las proteínas pueden ser lugares para las sustituciones de aminoácidos no naturales porque estos aminoácidos son expuestos a la superficie. Por lo tanto, la proteína natural puede tolerar grupos de azúcares voluminosos adheridos a las proteínas en estos lugares y los lugares de glicosilación tienden a estar ubicados lejos de los lugares de vinculación de receptores.

[0113] Miembros adicionales de la familia genética GH tiene buenas posibilidades de ser descubiertos en el futuro. Nuevos miembros de la familia súper genética GH pueden ser identificados por medio de análisis estructurales secundarios y terciarios asistidos por computadora de las secuencias proteínicas pronosticadas. Los miembros de la familia súper genética GH típicamente poseen cuatro o cinco hélices amfipáticas unidas por aminoácidos no helicoidales (las regiones de circuitos). Las proteínas podrían contener una secuencia con señal hidrofóbica en sus terminales de N para promover la secreción proveniente de la célula. Aquellos miembros que sean descubiertos después de la familia súper genética GH también podrían ser incluidos dentro de los métodos y composiciones aquí descritas. La aplicación de patente internacional titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos") (WO 05/074650 18 de agosto de 2005), suministra métodos para la selección de lugares e incorporación de aminoácidos no naturales en los polipéptidos.

#### V. *Aminoácidos no naturales*

[0114] Una amplia variedad de aminoácidos no naturales son adecuados para su uso en los métodos y composiciones aquí descritos mientras el aminoácido no natural tenga por lo menos una de las siguientes cuatro propiedades: (1) por lo menos un grupo funcional en la cadena lateral del aminoácido no natural con por lo menos

una característica y / o actividad y / o reactividad ortogonal a la reactividad química de los 20 aminoácidos codificados genéticamente comunes (es decir, alanina, arginina, aspargina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina), o por lo menos ortogonal a la reactividad química de los aminoácidos que ocurren naturalmente presentes en el polipéptido que incluye el aminoácido no natural; (2) el aminoácido no natural introducido es sustancialmente químicamente inerte hacia los 20 aminoácidos codificados genéticamente comunes; (3) el aminoácido no natural puede incorporarse establemente a un polipéptido; la estabilidad puede ser conmensurada con los aminoácidos que ocurren naturalmente o bajo condiciones fisiológicas típicas, y tal incorporación debe ocurrir por medio de un sistema in vivo; y (4) el aminoácido no natural incluye un grupo funcional de oximas o grupo funcional que puede ser transformado a un grupo de oximas al reaccionar con un reactivo, y puede ser reaccionado bajo condiciones que no destruyan las propiedades biológicas del polipéptido que incluye el aminoácido natural (a menos que el curso de aquella destrucción de las propiedades biológicas sea el propósito de la modificación/transformación), o preferiblemente cuando la transformación puede ocurrir bajo condiciones acuosas a un pH entre alrededor de 2 y 10 o un pH alrededor de 4 y 8, y el lugar del reactivo en el aminoácido no natural puede ser un lugar electrofílico. Ejemplos ilustrativos no limitantes de aminoácidos que puede satisfacer estas cuatro propiedades para aminoácidos no naturales que pueden ser utilizados con las composiciones y métodos están descritos en las aplicaciones de las patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068. Cualquier número de aminoácidos no naturales puede ser introducido a un polipéptido. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir oximas protegidos o enmascarados o grupos protegidos o enmascarados que puede ser transformados a grupos de oximas después de la desprotección del grupo protegido o desenmascarando el grupo enmascarado.

**[0115]** Los aminoácidos no naturales de interés que pueden ser adecuados para su uso en los métodos y composiciones aquí descritos incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos que contengan un reticulante fotoactivable, aminoácidos marcados de spin, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos que enlazan a metales, aminoácidos que contienen metales, aminoácidos vivos, aminoácidos con grupos funcionales nuevos, aminoácidos que interactúan covalentemente o no covalentemente con otras moléculas, aminoácidos photocaged o fotoisomerizables, aminoácidos que contienen biotina, un análogo de biotina, aminoácidos glicosilados tales como una serina sustituida con azúcar, otros aminoácidos modificados de carbohidratos, aminoácidos que contienen cetos, aminoácidos que contienen polietilenglicol o poliéter, aminoácidos con átomos pesados sustituidos, aminoácidos químicamente divisibles y / o fotodivisibles, aminoácidos con cadenas laterales alargadas en comparación de los aminoácidos naturales, incluyendo, pero sin limitarse a, poliéteres o hidrocarburos con cadenas largas, fluyendo, pero sin limitarse a, más de alrededor de cinco o más de alrededor de 10 carbonos, aminoácidos que contienen azúcar vinculada a carbonos, aminoácidos redox - activos, aminoácidos que contienen amino tioácidos, y aminoácidos que contienen una o más partículas tóxicas.

**[0116]** En algunas secciones, los aminoácidos no naturales incluyen una fracción de sacárido. Ejemplos de aquellos aminoácidos incluyen N-acetil-L-glucosaminil-L-serina, N-acetil-L-galactosaminil-L-serina, N-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, N-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y O- mannosaminil-L-serina. Ejemplos de aquellos aminoácidos también incluyen ejemplos donde el vínculo que ocurren naturalmente de N u O entre el aminoácido y el sacárido es reemplazado por un enlace covalente que no se encuentran comúnmente en la naturaleza - incluyendo, pero sin limitarse a, un alqueno, una oxima, un tioéter, una amida y similares. Ejemplos de aquellos aminoácidos también incluyen sacáridos que no son encontrados comúnmente en proteínas que ocurren naturalmente tales como 2-deoxiglucosa, 2-deoxigalactosa y similares.

**[0117]** Las partículas químicas que provienen de aminoácidos no naturales que suelen ser incorporadas a las proteínas ofrecen una variedad de ventajas y manipulaciones de la proteína. Por ejemplo, la única reactividad de un grupo funcional de carbonilos (incluyendo un grupo funcional ceto) permite una modificación selectiva de proteínas con cualquier número de reactivos que contienen hidracina o hidroxilamina in vitro e in vivo. Un aminoácido no natural de átomos pesados, por ejemplo, puede ser útil para ajustar las fases de datos estructurales de rayos X. La introducción a un lugar específico de átomos pesados utilizando aminoácidos no naturales también suministra selectividad y flexibilidad para escoger las posiciones de los átomos pesados. Aminoácidos no naturales foto reactivos (incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos con cadenas laterales de benzofenonas y arilazidas (incluyendo, pero sin limitarse a, fenilacida)), por ejemplo, permite una foto recirculación eficiente in vivo e in vitro de la proteína. Ejemplos de aminoácidos no naturales foto reactivos incluyen, pero no se limitan a, p-azido-fenilalanina y p-benzoil-fenilalanina. La proteína con los aminoácidos no naturales foto reactivos pueden ser foto reticulados entonces cuando se ha deseado por medio de la exacerbación del grupo foto reactivo que suministra un control temporal. En un ejemplo, el grupo metilo, de un aminoácido natural puede ser sustituido con un grupo isotópicamente marcado, que podría ser un grupo metilo, como una sonda de estructura y dinámica local, incluyendo, pero sin limitarse a, con el uso de resonancia magnética nuclear o espectroscopia vibratoria.

**[0118]** Muchos aminoácidos codificados no naturalmente son comercialmente disponibles, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), Novabiochem (una división de EMD Biosciences, Darmstadt, Alemania), o Peptech (Burlington, MA, EE.UU.). Aquellos que no son comercialmente disponibles pueden ser sintetizados opcionalmente. Para técnicas de síntesis orgánica, refiérase, por ejemplo, a Organic Chemistry (Química Orgánica) por Fessenden y



Fessendon, (1982, segunda edición, Willard Grant Press, Boston Mass.); *Advanced Organic Chemistry* (Química Orgánica Avanzada) por March (tercera edición, 1985, Wiley and Sons, Nueva York); y *Advanced Organic Chemistry* (Química Orgánica Avanzada) por Carey y Sundberg (tercera edición, partes A y B, 1990, Plenum Press, Nueva York). Muchos aminoácidos no naturales se basan en aminoácidos naturales, tales como tirosina, glutamina, fenilalanina, y similares.

#### A. *Absorción celular de aminoácidos no naturales*

[0119] La absorción de aminoácidos no naturales por una célula eucariota es un asunto que es típicamente considerado cuando se diseña y se selecciona a los aminoácidos no naturales, incluyendo, pero sin limitarse a, para su incorporación a una proteína. Por ejemplo, la densidad de alta carga de aminoácidos  $\alpha$  sugiere que estos compuestos tienen una alta posibilidad de no ser permeables a nivel celular. Aminoácidos naturales son absorbidos a la célula eucariota por medio de una colección de sistemas de transporte que se basa en proteínas. Una examinación rápida puede ser realizada la cual evalúa cuáles aminoácidos no naturales, si existiesen, son absorbidos por las células. Refiérase, por ejemplo, a los ensayos de toxicidad en, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos número US 2004/0198637 titulada "Protein Arrays" ("Agrupaciones Proteínicas"); y Liu, D.R. y Schultz, P.G. (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code (progreso hacia la evolución de un organismo con un código genético expandido). PNAS Estados Unidos 96:4780-4785. Aunque la absorción es fácilmente analizada con varios ensayos, una alternativa para diseñar los aminoácidos no naturales que son dóciles hacia los senderos de absorción celular es el suministrar senderos biosintéticos para crear aminoácidos in vivo.

#### B. *Biosíntesis de aminoácidos no naturales*

[0120] Muchos senderos biosintéticos ya existen en las células para la producción de aminoácidos y otros compuestos. Aunque puede que un método biosintético no exista para un aminoácido no natural específico en la naturaleza, incluyendo, pero sin limitarse a, una célula eucariota, los métodos y composiciones aquí descritas incluyen a aquellos métodos. Por ejemplo, senderos biosintéticos para aminoácidos no naturales son generados opcionalmente de en la célula anfitriona al agregar nuevas enzimas o modificar los senderos celulares anfitriones existentes. Nuevas enzimas adicionales son enzimas que opcionalmente ocurren naturalmente o enzimas evolucionadas artificialmente. Por ejemplo, la biosíntesis de p-aminofenilalanina (tal como se presenta en un ejemplo en WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of unnatural amino acids" ("incorporación in vivo de aminoácidos no naturales")) se basa en la agregación de una combinación de enzimas conocidas de otros organismos. Los genes para estas enzimas pueden ser introducidos a una célula eucariota al transformar la célula con un plásmido que contenga los genes. Los genes, cuando se expresan en la célula, suministran un sendero enzimático para sintetizar el compuesto deseado. Ejemplos de los tipos de enzimas que son agregados opcionalmente se suministran en los ejemplos más adelante. Secuencias enzimáticas adicionales se encuentran, por ejemplo, en el Banco Genético. Enzimas evolucionadas artificialmente también son agregadas opcionalmente a una célula en la misma forma. Asimismo, la maquinaria y recursos celulares de una célula son manipulados para producir aminoácidos no naturales.

[0121] Una variedad de métodos están disponibles para producir nuevas enzimas para su uso en senderos biosintéticos o para la evolución de senderos existentes. Por ejemplo, una recombinación recursiva, incluyendo, pero sin limitarse a, tal como lo desarrolló Maxygen, Inc. (disponible en el Internet en [www.maxygen.com](http://www.maxygen.com)), es utilizado opcionalmente para desarrollar nuevas enzimas y senderos. Refiérase, por ejemplo, a Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling (Evolución rápida de una proteína in vitro por medio de transposición de ADN), *Nature* (Naturaleza) 370(4):389-391; y, Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution (transposición de ADN por medio de fragmentaciones y remontajes aleatorios: recombinación in vitro para evolución molecular), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 91:10747-10751. Asimismo, DesignPath™, desarrollado por Genencor (disponible en el Internet en [genencor.com](http://genencor.com)) es utilizado opcionalmente para el diseño de senderos metabólicos, incluyendo, pero sin limitarse a, el diseño de un sendero para crear O-metil-L-tirosina en una célula. Esta tecnología reconstruye senderos existentes en organismos anfitriones utilizando una combinación de nuevos genes, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos identificados por medio de genómica funcional y evolución y diseño molecular. Diversa Corporation (disponible en el Internet en [diversa.com](http://diversa.com)) también suministra tecnología para examinar rápidamente las bibliotecas de genes y los senderos genéticos, incluyendo, pero sin limitarse a, la creación de senderos.

[0122] Típicamente, el aminoácido no natural producido con un sendero biosintético diseñado es producido en una concentración suficiente para una biosíntesis proteínica eficiente, incluyendo, pero sin limitarse a, un monto celular natural, pero no a niveles que puedan afectar la concentración de los otros aminoácidos o que puedan agotar los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas in vivo de esta forma son alrededor de 10 mM hasta 0.05 mM. Una vez que una célula es transformada con un plásmido que contiene los genes utilizados para producir las enzimas deseadas para generar el sendero específico en un aminoácido no natural, selecciones in vivo son utilizadas opcionalmente para optimizar aun más la producción del aminoácido no natural para la síntesis proteínica y el crecimiento celular ribosómico.

## VI. *Polipéptidos con aminoácidos no naturales*

[0123] Las composiciones y métodos descritos en mayor detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; las publicaciones de aplicación de patentes de Estados Unidos 2003/0082575 y 2003/0108885; WO 04/035743 titulada "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins" ("Incorporación en Lugares Específicos de Aminoácidos Cetos a Proteínas"), y la publicación PCT número WO 04/094593 titulada "Expanding the Eukaryotic Genetic Code" ("Expandiendo el Código Genético Eucariota") suministran la incorporación de por lo menos un aminoácido no natural a un polipéptido. El aminoácido no natural puede estar presente en cualquier ubicación del polipéptido, incluyendo cualquier posición terminal o cualquier posición interna del polipéptido. Los polipéptidos de aminoácidos no naturales aquí descritos pueden ser producidos biosintéticamente o no biosintéticamente el término biosintéticamente tiene la intención de describir a cualquier método que utiliza un sistema de traducción (celular o no celular), incluyendo el uso de por lo menos uno de los siguientes componentes: un polinucleótido, un codón, un tRNA, y un ribosoma. El término no biosintéticamente se refiere a cualquier método que no utilice un sistema de traducción: este método puede dividirse aún más en métodos utilizando métodos sintéticos de péptidos en estado sólido, métodos sintéticos de péptidos en fase sólida, métodos que utilizan por lo menos una enzima, y métodos que no utilizan por lo menos una enzima; desde luego cualquiera de estas subdivisiones puede superponerse y muchos métodos pueden utilizar una combinación de estas subdivisiones.

[0124] Los métodos, composiciones, estrategias y técnicas aquí descritas no se limitan a un tipo, clase o familia particular de polipéptidos o proteínas. De hecho, virtualmente cualquier polipéptido puede incluir pero no se limita a por lo menos un aminoácido no natural que se describen en más detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; las publicaciones de aplicación de patentes de Estados Unidos 2003/0082575 y 2003/0108885, WO 04/035743 titulada "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins" ("Incorporación en Lugares Específicos de Aminoácidos Ceto a Proteínas"), la publicación PCT número WO 04/094593 titulada "Expanding the Eukaryotic Genetic Code" ("Expandiendo el Código Genético Eucariota") y la publicación PCT WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y Sus Usos"). Los polipéptidos de aminoácidos no naturales pueden ser modificados aún más tal como se describe en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; WO 04/035743 titulada "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins" ("Incorporación en Lugares Específicos de Aminoácidos Ceto a Proteínas"), publicación PCT número WO 04/094593 titulada "Expanding the Eukaryotic Genetic Code" ("Expandiendo el Código Genético Eucariota") y la publicación PCT WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y Sus Usos"), o el polipéptido de aminoácidos no naturales puede ser utilizado sin más modificaciones. En un aspecto, una composición incluye por lo menos una proteína con por lo menos uno, incluyendo, pero sin limitarse a, por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, o por lo menos 10 o más aminoácidos no naturales. Los polipéptidos pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos naturales.

[0125] Aunque secciones de polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en mayor detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068 pueden ser sintetizadas químicamente por medio de métodos de síntesis de péptidos en fases sólidas (por ejemplo, en una resina sólida), por métodos de síntesis de péptidos en fases de solución, y/o sin la ayuda de enzimas. Otras secciones de los polipéptidos de aminoácidos no naturales aquí descritas permiten la síntesis por medio de una membrana celular, un extracto celular o un sistema de lisados o por medio de un sistema in vivo, es decir, utilizando la maquinaria celular de una célula procarionota o eucariota.

## VII. *Composiciones y Métodos que Involucran Ácidos Nucleicos y Oligonucleótidos*

### A. *Métodos Generales de Ácidos Nucleicos Recombinantes para su Uso*

[0126] Las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; y la publicación PCT WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos"), hablan acerca de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de interés (incluyendo, en forma de ejemplo, un polipéptido GH), y como podría ser aislado, clonado y a menudo alterado usando métodos recombinantes. Aquellas secciones son utilizadas, incluyendo, pero sin limitarse a, para expresiones proteínicas o durante la generación de variantes, derivados, cintas de expresión u otras secuencias derivadas de un polipéptido. En algunas secciones, las secuencias que codifican a los polipéptidos son vinculadas operacionalmente a un promotor heterólogo.

[0127] Una secuencia nucleotídica que codifica a un polipéptido que contiene un aminoácido no natural puede sintetizarse en base a la secuencia de aminoácidos del polipéptido paterno, y después se puede cambiar la secuencia de nucleótidos para efectivizar la introducción (es decir, incorporación o sustitución) o remoción (es decir,

eliminación o sustitución) del residuo o residuos del aminoácido relevante. La secuencia de nucleótidos puede ser modificada convenientemente por medio de mutagénesis dirigida a lugares específicos de acuerdo con los métodos convencionales. Alternamente, la secuencia de nucleótidos puede prepararse por medio de síntesis química, incluyendo, pero sin limitarse a, usando un sintetizador de oligonucleótidos, donde los oligonucleótidos si están diseñados basándose en una secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado, y preferiblemente seleccionando aquellos codones que son favorecidos en la célula anfitriona en la cual el polipéptido recombinante será producido. Por ejemplo, varios oligonucleótidos pequeños que codifican las porciones del polipéptido deseado pueden sintetizarse y ensamblarse por medio de una reacción PCR, ligación o ligación en cadena. Refiérase, por ejemplo, a Barany, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 189-193 (1991); EE.UU. 6,521,427.

### **B. Codones selectores**

**[0128]** Los codones selectores abarcados dentro de los métodos y composiciones son descritos en mayor detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; y la publicación PCT WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos"), expanden el marco de trabajo genético de los codones de la maquinaria biosintética proteínica. Por ejemplo, un codón selector incluye, pero no se limita a, un codón único de tres bases, un codón sin sentido, tal como un codón de terminación, incluyendo, pero sin limitarse a, un codón ámbar (amber) (UAG), o un codón ópalo (UGA), un codón ocre, un codón antinatural, un codón de cuatro o más bases, un codón raro, o similares. Existe una amplia gama en el número de codones electores que pueden ser introducidos a un gen deseado, incluyendo, pero sin limitarse, a uno o más, dos o más, tres o más, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más en un solo polinucleótido que codifica por lo menos una porción de un polipéptido de interés.

**[0129]** En algunos casos, involucra el uso de un codón selector que es un codón de terminación para la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales in vivo. La incorporación de aminoácidos no naturales in vivo puede realizarse sin una perturbación significativa de la célula anfitriona eucariota. Los codones electores también incluyen codones extendidos, incluyendo, pero sin limitarse a, cuatro o más codones, tales como, cuatro, 5, 6 o más codones base. Para un sistema particular, un codón selector también puede incluir uno de los codones naturales de tres bases, donde el sistema endógeno no utiliza (o lo utiliza raramente) el codón de base natural. Los codones electores incluyen, opcionalmente, parejas de bases no naturales. Estas parejas de bases no naturales expanden aún más el alfabeto genético existente. Para usos in vivo, el nucleósido no natural es una membrana permeable y es fosforilada para formar el trifosfato correspondiente. Adicionalmente, la información genética incrementada es estable y no es destruida por las enzimas celulares. Un sistema de elución de traducción también puede ser utilizado para incorporar un aminoácido no natural en un polipéptido deseado. En ciertas secciones, la proteína o polipéptido de interés (o su porción) es codificada por un ácido nucleico. Típicamente, el ácido nucleico comprende por lo menos un codón selector, por lo menos 2 codones selectores, por lo menos 3 codones selectores, por lo menos 4 codones selectores, por lo menos 5 codones selectores, por lo menos 6 codones selectores, por lo menos 7 codones selectores, por lo menos 8 codones selectores, por lo menos 9 codones selectores, 10 o más codones selectores.

### **VIII. Generación in vivo de polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales**

**[0130]** Los polipéptidos pueden ser generados in vivo utilizando sintetetasas tRNA modificadas y sintetetasas tRNA para añadir o sustituir aminoácidos que no están codificados en sistemas que ocurren naturalmente. Todos los métodos para generar y examinar los organismos utilizados para la generación in vivo de polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales son explicados en mayor detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; las publicaciones de aplicaciones de patentes de Estados Unidos 2003/0082575 y 2003/0108885, la publicación PCT número WO 04/094593 titulada "Expanding the Eukaryotic Genetic Code" ("Expandiendo el Código Genético Eucariota") y la publicación PCT WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos").

**[0131]** Los métodos para generar sintetetasas tRNAs y tRNA que utilizan aminoácidos que no están codificados en sistemas que ocurren naturalmente se describen en, por ejemplo, las publicaciones de aplicaciones de patentes de Estados Unidos 2003/0082575 y 2003/0108885. Estos métodos involucran generar una maquinaria de traducción que funciona independientemente de las sintetetasas y tRNAs endógenas al sistema de traducción (y son, por lo tanto, a veces referidas como "ortogonales"). En otras secciones adicionales, el sistema de traducción incluye un tRNA ortogonal (O-tRNA) y una sinteteta aminoacil tRNA ortogonal (O-RS). Una amplia gama de sintetetasas tRNAs ortogonales y aminoacil tRNA han sido descritas en la industria para insertar aminoácidos sintéticos específicos a polipéptidos, y son generalmente adecuados para producir los polipéptidos de aminoácidos no naturales.

**[0132]** El uso de sintetetasas O-tRNA / aminoacil-tRNA involucra la selección de un codón específico que codifica el aminoácido no natural. Aunque cualquier codón puede ser utilizado, es generalmente deseable el seleccionar un codón que ha sido utilizado rara vez o que nunca ha sido utilizado en la célula en la cual la sinteteta O-tRNA / aminoacil-tRNA es expresada. Cordones selectores específicos pueden ser introducidos a posiciones apropiadas de

la secuencia codificadora del polinucleótido usando métodos de mutagénesis conocidos en la industria (incluyendo, pero sin limitarse a, mutagénesis en lugares específicos, mutagénesis de cinta, mutagénesis de selección de restricción, etcétera).

## 5 **A. Expresión en no Eucariotas y eucariotas**

[0133] Para obtener un alto nivel de expresión de un polinucleótido clonado, se debe sub clonar técnicamente los polinucleótidos que codifican a un polipéptido deseado a un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de transcripción / traducción, y si fuese para un ácido nucleico que codifica a una proteína, un lugar de vinculación ribosómico para la iniciación de la traducción. Promotores adecuados de bacterias son bien conocidos en la industria y son descritos, por ejemplo, en Sambrook et al. y Ausubel et al. sistemas de expresión bacterianas y sistemas celulares anfitriones eucariotas o no eucariotas son descritos en mayor detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; las publicaciones de aplicaciones de patentes de Estados Unidos 2003/0082575 y 2003/0108885, la publicación PCT número WO 04/094593 titulada "Expanding the Eukaryotic Genetic Code" ("Expandiendo el Código Genético Eucariota") y la publicación PCT WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos") pueden ser utilizadas para biosintetizar proteínas que contienen aminoácidos no naturales en cantidades grandes y útiles.

### 20 1. Sistemas, cultivos y aislamiento de expresiones

[0134] El polipéptido deseado puede ser expresado en cualquier número de sistemas de expresión adecuados, incluyendo, por ejemplo, levaduras, células de insectos, células de mamíferos, células pseudomonas, y bacterias. Una descripción de ejemplos de sistemas de expresión se describen en mayor detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; las publicaciones de aplicaciones de patente de Estados Unidos 2003/0082575 y 2003/0108885, la publicación PCT No. WO 04/094593 titulada "Expanding the Eukaryotic Genetic Code" ("Expandiendo el Código Genético Eucariota") y la publicación PCT WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos").

### 30 2. Purificación de los Polipéptidos de Aminoácidos No Naturales

[0135] Los Métodos Generales de Purificación. Se pueden realizar una variedad de pasos de aislamiento en los lisados, extractos, medio de cultivo, cuerpos de inclusión, espacios periplásmicos celulares de las células anfitrionas, citoplastos de las células anfitrionas u otro material que contenga el polipéptido deseado o las mezclas que resulten de cualquier paso de aislamiento incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de filtración de geles, cromatografía de líquidos de alto rendimiento ("HPLC" - high performance liquid chromatography), fase reversa de HPLC ("RP-HPLC" - reversed phase-HPLC), absorción de camas expandidas o cualquiera de sus combinaciones y / o repeticiones en cualquier orden apropiado. Los métodos, equipos, secciones importantes de purificación generales y otras técnicas de purificación se describen en mayor detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; y WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos").

## 45 **B. Modificaciones Post – Traducciones In Vivo**

[0136] Al producir las proteínas o los polipéptidos de interés con por lo menos un aminoácido no natural en células eucariotas, las proteínas o polipéptidos incluyen a las modificaciones eucariotas post - traducción. En ciertas secciones, una proteína incluye por lo menos un aminoácido no natural y por lo menos una modificación post - traducción que es hecha in vivo por una célula eucariota, donde la modificación post - traducción no es hecha por una célula procariota. Por ejemplo, la modificación post - traducción está descrita en mayor detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; y WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos").

[0137] Una ventaja de un aminoácido no natural es que este presenta fracciones químicas adicionales que pueden ser utilizadas para añadir moléculas adicionales. Estas modificaciones pueden ser hechas in vivo en una célula eucariota o no eucariota, o in vitro. Por lo tanto, en ciertas secciones, la modificación post - traducción es a través del aminoácido no natural.

## 60 **IX. Expresión de Sistemas Alternos**

5 [0138] Varias estrategias han sido utilizadas para introducir aminoácidos no naturales en proteínas en células anfitrionas no recombinantes, células anfitrionas sujetas a mutagénesis o en sistemas de células libres. Estos sistemas también son apropiados para utilizarse en la elaboración de polipéptidos de aminoácidos no naturales. La derivación de aminoácidos con cadenas laterales reactivas tales como Lys, Cys y Tyr resultaron en la conversión de lisina a N<sup>2</sup>-acetil-lisina. La síntesis química también suministra un método directo para incorporar aminoácidos no naturales. Con el desarrollo reciente de la ligación enzimática y la ligación de químicos nativos de fragmentos de péptidos, es posible elaborar proteínas más grandes. Refiérase, por ejemplo, a P. E. Dawson y S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 69:923 (2000). Las indicaciones químicas de Péptidos y las obligaciones químicas nativas son descritas en la patente de Estados Unidos número 6,184,344, la patente de Estados Unidos No. 2004/0138412, la publicación de patente de Estados Unidos número 2003/0208046, WO 02/098902, y WO 03/042235. Un método biosintético in vitro general en el cual un supresor tRNA acilado con el aminoácido no natural deseado es agregado a un extracto in vitro capaz de soportar una biosíntesis proteínica, que ha sido utilizada para incorporar específicamente en un sitio más de 100 aminoácidos no naturales en una variedad de proteínas de virtualmente cualquier tamaño. Refiérase, por ejemplo, a 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 unnatural amino acids into proteins (Un método general para la incorporación en un lugar específico de aminoácidos no naturales en proteínas), *Science (Ciencia)* 244:182-188 (1989); y, J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Diala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide (Incorporación biosintética en un lugar específico de un aminoácido no natural en un polipéptido), *J. Am. Chem. Soc.* 111:8013-8014 (1989). Un amplio rango de grupos funcionales ha sido introducido a proteínas para estudios de estabilidad proteínica, plegado proteínico, mecanismo enzimático y traducción de señales.

25 [0139] Un método in vivo, denominado incorporación selectiva de presión, fue desarrollado para aprovechar la promiscuidad de las sintetasas de tipo silvestre. Refiérase, por ejemplo, a 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 cual el sendero metabólico relevante que suministra a la célula con un aminoácido natural particular es desactivada, es cultivada en un medio mínimo que contiene concentraciones limitadas de aminoácidos naturales, mientras la transcripción del gen objetivo es reprimida. Al inicio de la fase de crecimiento estacionaria, el aminoácido natural es agotado y reemplazado con el análogo del aminoácido no natural. La inducción de la expresión de la proteína recombinante resulta en la acumulación de una proteína que contiene al análogo no natural. Por ejemplo, utilizando esta estrategia, o, m y p-fluorofenilalaninas han sido incorporadas a proteínas, y exhiben dos soportes característicos en el espectro UV que puede ser fácilmente identificados, refiérase, por ejemplo, a C. Minks, R. Huber, L. Moroder y N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000); trifluorometiona ha sido utilizada para reemplazar a metionina en la lisozima T4 bacteriófaga para estudiar su interacción con los ligandos quitooligosacárido por <sup>19</sup>F NMR, refiérase, por ejemplo, a H. Duewel, E. Daub, V. Robinson y J. F. Honek, *Biochemistry, (Bioquímica)* 36:3404 (1997); y la trifluoroleucina ha sido incorporada en lugar de leucina, resultando en el incremento de una estabilidad térmica y química. Refiérase, por ejemplo, a Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado y D. A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40:1494 (2001). Además, seleniometionina y telurometionina son incorporados a varias proteínas recombinantes para facilitar la solución de las fases en la cristalografía de rayos X. Refiérase, por ejemplo, a W. A. Hendrickson, J. R. Horton y D. M. Lemaster, *EMBO J.*, 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebeda 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. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeind, L. Moroder y R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270:616 (1997). Análogos de metionina con funcionalidades de alquenos o alquinos también han sido incorporadas eficientemente, permitiendo modificaciones adicionales a las proteínas por medios químicos. Refiérase, por ejemplo, a 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. Kiick y D. A. Tirrell, *Tetrahedron (Tetraedro)*, 56:9487 (2000); patente de Estados Unidos número 6,586,207; publicación de la patente de Estados Unidos número 2002/0042097.

50 [0140] El éxito de este método depende del reconocimiento de los análogos de aminoácidos no naturales por las sintetasas aminoacil - tRNA, que, en general, requieren una alta selectividad para asegurar la fidelidad de la traducción proteínica. Una forma para expandir el alcance de este método es el suavizar la especificidad del sustrato de las sintetasas aminoacil-tRNA, lo cual ha sido logrado en un número limitado de casos. Por ejemplo, el reemplazo de Ala<sup>294</sup> por Gly en sintetasa fenilalanil-tRNA del *Escherichia coli* (PheRS - phenylalanyl-tRNA synthetase) incrementa el tamaño de la bolsa de vinculación del sustrato, y resulta en la acilación de la tRNA<sup>Phe</sup> por la p-Cl-fenilalanina (p-Cl-Phe - p-Clphenylalanine). Refiérase a, M. Ibba, P. Kast y H. Hennecke, *Biochemistry (Bioquímica)*, 33:7107 (1994). Una cepa de *Escherichia coli* que acoge a esta PheRS mutante permite la incorporación de la p-Cl-fenilalanina o de la p-Br-fenilalanina en lugar de la fenilalanina. Refiérase a, por ejemplo, M. Ibba y H. Hennecke, *FEBS Lett.*, 364:272 (1995); y, N. Sharma, R. Furter, P. Kast y D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 467:37 (2000). Asimismo, una Phe130Ser con una mutación en un punto cerca del lugar de vinculación del aminoácido de la sintetasa tiosil-tRNA en la *Escherichia coli* ha demostrado permitir que la azatirosina se incorpore más eficientemente que la tirosina. Refiérase, a 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).

**[0141]** Otra estrategia para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas in vivo es el modificar las sintetetas que tienen mecanismos de revisión. Estas sintetetas no pueden discriminar y por lo tanto activan a los aminoácidos que son similares estructuralmente que los aminoácidos naturales afines. Este error es corregido en un lugar separado, que desacila el aminoácido cargado erróneamente del tRNA para mantener la fidelidad de la traducción proteínica. Si la actividad de revisión de la sinteteta se deshabilita, los análogos estructurales que son activados erróneamente podrían escapar a la función de edición y serían incorporados. Este método ha sido demostrado recientemente con las sintetetas valil-tRNA (ValRS - valyl-tRNA synthetase). Refiérase a, V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel y P. Marliere, *Science (Ciencia)*, 292:501 (2001). ValRS pueden acilar aminos erróneamente a tRNA<sup>Val</sup> con Cys, Thr o aminobutirato (Abu); estos aminoácidos afines son subsecuentemente hidrolizados por el dominio editor. Después de mutagénesis aleatorias del cromosoma de *Escherichia coli*, una cepa de *Escherichia coli* mutante fue seleccionada que tiene una mutación en el lugar de edición de la ValRS. Esta ValRS defectiva en lo que se refiere a edición carga incorrecta a la tRNA<sup>Val</sup> con Cys. Puesto que Abu se asemeja estéricamente a Cys (el grupo -SH de Cys es reemplazado con -CH<sub>3</sub> en Abu), la ValRS mutante también incorpora a Abu en las proteínas cuando esta cepa mutante de *Escherichia coli* es cultivada en la presencia de Abu. Un análisis espectrométrico de masa muestra que alrededor del 24% de valinas son reemplazadas por Abu en cada posición de valina en la proteína nativa.

**[0142]** Los métodos de síntesis de fase sólida y semi sintéticos también han permitido la síntesis de un número de proteínas que contienen aminoácidos nuevos. Por ejemplo, refiérase a las siguientes publicaciones y referencias aquí citadas: Crick, F.H.C., Barrett, L. Brenner, S. Watts-Tobin, R. General nature of the genetic code for proteins. *Nature (Naturaleza general del código genético para proteínas. Naturaleza)*, 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 (Estudios en polipéptidos. XXXVI. El efecto de reemplazos pirazol - imidazol en la potencia de activación de la proteína S de un fragmento de péptido S) *S. J. Am Chem*, 88(24):5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes (Métodos sintéticos para péptidos y proteínas biológicamente activas incluyendo enzimas), *Acc Chem Res*, 22:47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin (Acoplamiento de segmentos de péptidos catalizado por la enzima semi - sintética tiosubtilisina), *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 (Construyendo proteínas ensamblando péptidos sintéticos no protegidos: protease de VIH de esqueleto diseñado, Ciencia)*, 256(5054):221-225 (1992); Chaiken, I.M Semisynthetic peptides and proteins (Péptidos y proteínas semi - sintéticos), *CRC Crit Rev Biochem*, 11(3):255-301 (1981); Offord, R.E. Protein engineering by Chemical means? *Protein Eng. (¿Ingeniería proteínica por medio de medios químicos? Ingeniería Proteínica)*, 1(3):151-157 (1987); y, 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 Unnatural Catalytic Residues, *Science (Una Ligasa de Péptidos Diseñados para una Síntesis Total de Ribonucleasa A con Residuos Catalíticos No Naturales, Ciencia)*, 266(5183):243 (1994).

**[0143]** La modificación química ha sido usada para introducir una variedad de cadenas laterales no naturales, incluyendo cofactores, marcadores espín y oligonucleótidos en proteínas in vitro. Refiérase, por ejemplo, a Corey, D.R., Schultz, P.G. Generation of a hybrid sequencespecific single-stranded deoxyribonuclease, *Science (Generación de una deoxiribonucleasa de una sola cepa híbrida de una secuencia específica, Ciencia)*, 238(4832):1401-1403 (1987); Kaiser, E.T., Lawrence D.S., Rokita, S.E. The chemical modification of enzymatic specificity (La modificación química de la especificidad enzimática), *Annu Rev Biochem*, 54:565-595 (1985); Kaiser, E.T., Lawrence, D.S. Chemical mutation of enzyme active sites, *Science (Mutación química de lugares activos de las enzimas, ciencia)*, 226(4674):505-511 (1984); Neet, K.E., Nanci A, Koshland, D.E. Properties of thiol-subtilisin (Propiedades de la tiol-subtilisina), *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 (Una nueva enzima que contiene un lugar activo formado sintéticamente. Tiol-subtilisina). *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 (Introducción a sondas, de nucleótidos y espectroscópicas en lugares de combinación de anticuerpos, Ciencia)* 242(4881):1038-1040 (1988).

**[0144]** Alternamente, métodos biosintéticos que utilizan aminoacil - tRNAs modificados químicamente han sido utilizados para incorporar algunas sondas biofísicas en proteínas sintetizadas in vitro. Refiérase a las siguientes publicaciones y referencias aquí citadas: Brunner, J. New Photolabeling and crosslinking methods (Nuevos métodos de foto marcación y articulación), *Annu. Rev Biochem*, 62:483-514 (1993); y, Krieg, U.C., Walter, P., Hohnsen, A.E. Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54- kilodalton polypeptide of the signal recognition particle (foto reticulación de la secuencia de señalización de la preprolactina naciente del polipéptido de 54 kilodaltones), *Proc. Natl. Acad. Sci*, 83(22):8604-8608 (1986).

**[0145]** Previamente, ha sido demostrado que los aminoácidos no naturales pueden ser incorporados específicamente a lugares dentro de las proteínas in vitro por medio de la adición de tRNAs supresoras aminoaciladas químicamente a reacciones de síntesis de imidas programadas con un gen que contiene una mutación sin sentido ámbar deseada. Usando estos métodos se ha de sustituir un número de los 20 aminoácidos

- comunes con homólogos estructuralmente cercanos, es decir, fluorofenilalanina por fenilalanina, usando cepas auxotróficas para un aminoácido en particular. Refiérase a, por ejemplo, Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science* (Un método general para la incorporación en un lugar específico de aminoácidos no naturales a proteínas, *Ciencia*), 244: 182-188 (1989); M.W. Nowak, et al., *Science* (Ciencia) 268:439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. Biosynthetic sitespecific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide (Incorporación biosintética en un lugar específico de un aminoácido no natural a un polipéptido), *J. Am Chem Soc*, 111:8013-8014 (1989); N. Budisa et al., *FASEB J.* 13:41-51 (1999); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins, *Methods in Enz.* (Método biosintético para introducir aminoácidos no naturales en sitios específicos de proteínas. Métodos en Ens.), vol. 202, 301-336 (1992); y, Mendel, D., Cornish, V.W. & Schultz, P.G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code (Mutagénesis dirigida a sitios con un código genético expandido), *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.* 24, 435-62 (1995).
- 5
- 10
- 15 **[0146]** Por ejemplo, un tRNA supresor fue preparado para reconocer el UAG del codón de terminación y fue aminoacilado químicamente con un aminoácido no natural. Una mutagénesis convencional dirigida a lugares fue utilizada para introducir el TAG del codón de terminación, en el sitio de interés en el gen proteínico. Refiérase, por ejemplo, a Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res* (Exonucleasas en mutagénesis dirigida por oligonucleótidos basada en fosforotioato), 16(3):791-802 (1988). Cuando el tRNA supresor acilado y el gen mutante fueron combinados en un sistema de transcripción/traducción in vitro, el aminoácido natural fue incorporado en respuesta al codón UAG que le dio una proteína que contenía ese aminoácido en la posición especificada. Experimentos utilizando [<sup>3</sup>H]-Phe y experimentos con ácidos α-hidroxi demostraron que solamente los aminoácidos deseados se incorporaron en la posición especificada por el codón UAG y que este aminoácido no es incorporado en ningún otro sitio en la proteína. Refiérase, por ejemplo, a Noren, et al, mencionado anteriormente; Kobayashi et al., (2003) *Nature Structural Biology* (Biología Estructural Natural) 10(6):425-432; y, Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, *Science* (Incorporación en lugares específicos de estructuras de nuevos esqueletos en proteínas. *Ciencia*), 255(5041):197-200 (1992).
- 20
- 25
- 30 **[0147]** Un tRNA puede ser aminoacilado con un aminoácido deseado por medio de cualquier método o técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, aminoacilación química o enzimática.
- [0148]** La aminoacilación puede lograrse por medio de sintetasa tRNA de aminoacilos o por medio de otras moléculas enzimáticas, incluyendo pero sin limitarse a, ribozimas. El término "ribozima" es intercambiable con "ARN catalítico". Cech y compañeros de trabajo (Cech, 1987, *ciencia*, 236:1532-1539; McCorkle et al., 1987, *Concepts Biochem.* 64:221-226) demostró la presencia de ARNs que ocurren naturalmente que pueden actuar como catalizadores (ribozimas). Sin embargo, aunque estos catalizadores de ARN natural sólo han demostrado actuar en sustratos de ácidos ribonucleicos para división y empalme, el desarrollo reciente de la evolución artificial de ribozimas ha expandido el repertorio de catálisis para varias reacciones químicas. Estudios han identificado moléculas de ARN que pueden catalizar enlaces de aminoacil-ARN en su propia terminal (2')3' (Illangakekare et al., 1995 *Science* (Ciencia) 267:643-647), y una molécula ARN que puede transferir un aminoácido desde una molécula ARN a otra (Lohse et al., 1996, *Nature* (Naturaleza) 381:442-444).
- 35
- 40
- 45 **[0149]** La publicación de la aplicación de patente de Estados Unidos 2003/0228593, describe métodos para construir ribozimas y sus usos en la aminoacilación de tRNAs con aminoácidos codificados naturalmente y no naturalmente. Formas inmovilizadas de sustratos de moléculas enzimáticas que pueden aminoacilar tRNAs, incluyendo, pero sin limitarse a, ribozimas, podrían habilitar una purificación eficiente de la afinidad de los productos aminoacilados. Ejemplos de sustratos adecuados incluyen agarosa, sefarosa y esferas magnéticas. La producción y el uso de un sustrato en forma inmovilizada de ribozimas para aminoacilación se describe en *Chemistry and Biology* (Química y Biología) 2003, 10:1077-1084 y la publicación de la aplicación de la patente de Estados Unidos 2003/0228593.
- 50
- [0150]** Métodos de aminoacilación química incluyen, pero no se limitan a, aquellos introducidos por Hecht y compañeros de trabajo (Hecht, S. M. *Acc. Chem. Res.* 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. *Biochemistry* (Bioquímica) 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. *J. Biol. Chem.* 1978, 253, 4517) y por 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* (Ciencia) 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. et al. *Nature* (Naturaleza) 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. *Chem. Biol.* 1997, 4, 740; Turcatti, et al. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. et al. *Science* (Ciencia), 1995, 268, 439; Saks, M. E. et al. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 34), para evitar el uso de sintetasa en aminoacilación. Esos métodos u otros métodos de aminoacilación química pueden ser utilizados para aminoacilar moléculas tRNA del invento.
- 55
- 60

**[0151]** Métodos para generar ARN catalítico involucran el generar agrupaciones separadas de secuencias de ribozimas en forma aleatoria, realizar una evolución dirigida en las agrupaciones, examinar las agrupaciones en búsqueda de actividad de aminoacilación deseable, y seleccionar secuencias de aquellas ribozimas que muestran la actividad deseada de aminoacilación.

5 **[0152]** Las ribozimas pueden conformar motivos y / o regiones que faciliten la actividad de acilación, tal como un motivo GGU y una región rica en U. Por ejemplo, se ha reportado que regiones ricas en U pueden facilitar el reconocimiento de un sustrato de aminoácidos, y que un motivo GGU puede formar parejas de bases con la terminal 3' de un tRNA. En combinación, la GGU, el motivo y la región rica en U facilitan un reconocimiento simultáneo del aminoácido y del tRNA, y por lo tanto facilitan la aminoacilación de la terminal 3' de la tRNA.

10 **[0153]** Las ribozimas pueden generarse por medio de selección in vitro usando un r24mini parcialmente aleatorio con tRNA<sup>Asn</sup>CCCG, seguido de una ingeniería sistemática de una secuencia consensual encontrada en los clones activos. Un ejemplo de una ribozima obtenida con este método se lo denomina "ribozima Fx3" y se lo describe en la publicación de aplicación de Estados Unidos número 2003/0228593, y actúa como un catalizador versátil para la síntesis de varios aminoacil-tRNAs cargados con aminoácidos no naturales afines.

15 **[0154]** Las ribozimas tRNAs aminoaciladas pueden ser inmovilizadas en un sustrato para permitir una purificación eficiente de la afinidad de los tRNAs aminoacilados. Ejemplos de sustratos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agarosa, sefarosa y esferas magnéticas. Las ribozimas pueden ser inmovilizadas en resinas aprovechando la estructura química del ARN, tal como el 3'-cis-diol en la ribosa del ARN puede ser oxidada con peryodato para generar el correspondiente dialdehído para facilitar la inmovilización del ARN en la resina. Varios tipos de resinas pueden ser utilizados incluyendo resinas hidrazidas baratas en las cuales la aminación reductora convierte a la interacción entre la resina y la ribozima en un enlace irreversible. La síntesis de aminoacil-tRNAs puede ser facilitado significativamente por medio de esta técnica de aminoacilación en columnas. Kourouklis et al. Methods (Métodos) 2005; 36:239-4 describe un sistema de aminoacilación que se basa en columnas.

20 **[0155]** El aislamiento de tRNAs aminoacilados puede lograrse en varias formas. Un método adecuado es el eluir los tRNAs aminoacilados de una columna con un amortiguador tal como una solución de acetato de sodio con 10mM de EDTA, un amortiguador que contiene 50mM de ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(3-propanesulfónico), 12.5 mM de KCl, pH 7.0, 10mM de EDTA o simplemente agua amortiguada con EDTA (pH 7.0)

25 **[0156]** Los tRNAs aminoacilados pueden aumentarse para reacciones de traducción para incorporar el aminoácido con el cual la tRNA fue aminoacilada en una posición escogida en un polipéptido elaborado por la reacción de traducción. Ejemplos de sistemas de traducción en los cuales las tRNAs aminoaciladas de este invento pueden ser utilizados incluyen, pero no se limitan a, lisados celulares. Los lisados celulares distan los componentes de reacción necesarios para una traducción in vitro de un polipéptido desde un ARNm ingresado. Ejemplos de tales componentes de reacción incluyen, pero no se limitan a proteínas ribosómicas, rRNA, aminoácidos, tRNAs, GTP, ATP, factores de iniciación de traducción y alargamiento y factores adicionales asociados con la traducción. Adicionalmente, los sistemas de traducción pueden ser traducciones por lotes o traducciones por compartimientos. Los sistemas de traducción por lotes combinan componentes de reacción en un solo compartimiento mientras que los sistemas de traducción por compartimientos separan los componentes de reacción de traducción desde los productos de reacción que pueden inhibir la eficiencia de la traducción. Aquellos sistemas de traducción están disponibles comercialmente.

30 **[0157]** Además, un sistema de transcripción / traducción acoplado podría ser utilizado. Los sistemas de transcripción / traducción acoplados permiten una transcripción de un ADN ingresado a su correspondiente ARNm el cual a su vez es traducido por los componentes de reacción. Un ejemplo de un sistema de transcripción / traducción acoplado disponible es el Sistema Rápido de Traducción (RTS - Rapid Translation System, Roche Inc.). El sistema incluye una mezcla que contiene un lisado de E. coli para suministrar componentes de traducción tales como ribosoma y factores de traducción. Adicionalmente, una polimerasa ARN es incluida para la transcripción del ADN ingresado a una plantilla de ARNm para su uso en la traducción. El RTS puede usar compartimientos de los componentes de reacción por medio de una membrana interna puesta entre los componentes de reacción, incluyendo un compartimiento de suministro / desechos y un compartimiento de transcripción / traducción.

35 **[0158]** La aminoacilación de tRNA puede realizarse por otros reactivos, incluyendo pero sin limitarse a, transferasas, polimerasas, anticuerpos catalíticos, proteínas multi - funcionales, y similares.

40 **[0159]** Stephan en Scientist (Científico) 10 de octubre de 2005; páginas 30-33 describe métodos adicionales para incorporar aminoácidos codificados no naturalmente a proteínas. Lu et al. in Mol Cell. Oct de 2001;8(4):759-69 describe un método en el cual una proteína es ligada químicamente a un péptido sintético que contiene aminoácidos no naturales (expresado en la ligación de la proteína).

45 **[0160]** Técnicas de microinyección también han sido usadas para incorporar aminoácidos no naturales a las proteínas. Refiérase, por ejemplo, a 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 and H. A. Lester, *Science (Ciencia)*, 268:439 (1995); y, D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:645 (2000). Un oocito *Xenopus* fue co - inyectado con dos especies de ARN hechas in vitro: un ARNm que codificaba una proteína objetiva con un cordón de terminación UAG en la posición del aminoácido de interés y una tRNA supresora ámbar aminoacilada con el aminoácido no natural deseado. La maquinaria de traducción del oocito inserta entonces el aminoácido natural en la posición especificada por el UAG. Este método ha permitido investigaciones de la función estructural in vivo de las proteínas de las membranas integrales, que generalmente no son dóciles a los sistemas de expresión in vitro. Ejemplos incluyen la incorporación de un aminoácido fluorescente en el receptor taquiquinina de neuroquinina-2 para medir las distancias por medio de una transferencia de energía de resonancia fluorescente, referirse a, 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 a la superficie en canales iónicos, refiérase, por ejemplo a, J. P. Gallivan, H. A. Lester y D. A. Dougherty, *Chem. Biol.*, 4:739 (1997); el uso de análogos de tirosina enjaulados para monitorear los cambios conformacionales en un canal iónico en tiempo real, refiérase a, por ejemplo, J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty y H. A. Lester, *Neuron*, 20:619 (1998); y, el uso de aminoácidos de hidroxilo para cambiar los esqueletos del canal iónico para sondear sus mecanismos de conexión. Refiérase, por ejemplo, a P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty y H. A. Lester, *Cell (célula)*, 96:89 (1999); y, T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz and J. Yang, *Nat. Neurosci.*, 4:239 (2001).
- 5
- 10
- 15
- 20 **[0161]** La habilidad para incorporar aminoácidos no naturales directamente a las proteínas in vivo ofrece las ventajas de altos niveles de producción de las proteínas mutantes, facilidad técnica, el potencial para estudiar a las proteínas mutantes en las células o posiblemente en los organismos vivos y el uso de estas proteínas mutantes en tratamientos terapéuticos. La habilidad para incluir aminoácidos no naturales de varios tamaños, niveles de acidez, nucleofilicidades, hidrofobicidades, y otras propiedades a las proteínas pueden expandir enormemente nuestra capacidad para manipular racionalmente y sistemáticamente las estructuras de las proteínas, la función proteínica y la creación de nuevas proteínas u organismos con propiedades novedosas. Sin embargo, el proceso es difícil, debido a la naturaleza compleja de las interacciones de las tRNA - sintetasas que son requeridas para lograr un alto nivel de fidelidad en la traducción proteínica.
- 25
- 30 **[0162]** En un intento para incorporar en un lugar específico para-F-Phe, una pareja de sintetasa tRNAPheCUA /fenilalanil-tRNA supresora de levadura ámbar fue utilizada en una cepa de *Escherichia coli* autótrofa Phe resistente a p-F-Phe. Refiérase, por ejemplo, a R. Furter, *Protein Sci. (Sci. Proteínica)*, 7:419 (1998). También sería posible obtener una expresión de un polinucleótido utilizando un sistema de traducción libre de células (in vitro). Los sistemas de traducción pueden ser celulares o libres de células, y pueden ser procariotas o eucariotas. Los sistemas de traducción celular incluyen, pero no se limitan a, preparaciones celulares con letras tales como células permeabilizadas o cultivos celulares donde una secuencia de ácido nucleico deseada puede ser transcrita al ARNm y este ha de ser traducido. Sistemas de traducción libres de células son comercialmente disponibles y muchos tipos y sistemas diferentes son bien conocidos. Ejemplos de sistemas libres de células incluyen, pero no se limitan a lisados procariotas tales como lisados de *Escherichia coli* y lisados eucariotas tales como extractos germinales de trigo, lisados de células de insectos, lisados de eritrocitos de conejos, lisados de oocitos de conejos y lisados de células humanas. Extractos o lisados eucariotas pueden ser preferidos cuando la proteína resultante es glicosilada, fosforilada o modificada de otra forma porque muchas modificaciones también son posibles en sistemas eucariotas. Algunos de estos extractos y lisados son disponibles comercialmente (Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif.; Amersham; Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL; Grand Island, N.Y.). Extractos de membranas, tales como los extractos pancreáticos caninos que contienen membranas microsomales, que están disponibles las cuales son útiles para proteínas de secreción de traducción. En estos sistemas, que pueden incluir ARNm como una plantilla (traducción in vitro) o ADN como una plantilla (transcripción y traducción in vitro combinadas), la síntesis in vitro es dirigida por los ribosomas. Un esfuerzo considerable ha sido aplicado al desarrollo de sistemas de expresión proteínicos libres de células. Refiérase, por ejemplo, a Kim, D.M. y J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering (Biotecnología y Bioingeniería)*, 74 :309-316 (2001); Kim, D.M. y J.R. Swartz, *Biotechnology Letters (Cartas de Biotecnología)*, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M., y J.R. Swartz, *Biotechnology Progress (Progreso de la Biotecnología)*, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M., y J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering (Biotecnología y Bioingeniería)*, 66, 180-188, (1999); y Patnaik, R. y J.R. Swartz, *Biotechniques (Biotécnicas)* 24, 862-868, (1998); patente de Estados Unidos número 6,337,191; publicación de la patente de Estados Unidos números 2002/0081660; WO 00/55353; WO 90/05785. Otro método que podría aplicarse a la expresión de polipéptidos de aminoácidos no naturales, incluye la técnica de fusión del péptido - ARNm. Refiérase, por ejemplo, a R. Roberts y J.Szostak, *Proc. Natl Acad. Sci. (EE.UU.)* 94:12297-12302 (1997); A. Frankel, et al., *Chemistry & Biology (Química y Biología)* 10:1043-1050 (2003). En este método, una plantilla ARNm vinculada a puromicina es traducido al péptido en el ribosoma. Si una o más moléculas tRNA han sido modificadas, aminoácidos no naturales pueden ser incorporados al péptido también. Después de que el último codón de ARNm ha sido leído, la puromicina captura el terminal C del péptido. Si se encuentra que la conjugación resultante péptido - ARNm tiene propiedades interesantes en un ensayo in vitro, su identidad puede ser revelada fácilmente de la secuencia ARNm. En esta forma, se podrían examinar bibliotecas de polipéptidos de aminoácidos no naturales para identificar los polipéptidos que tienen las propiedades deseadas. Más recientemente, se ha reportado que traducciones ribosómicas in vitro con componentes purificados
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

permiten la síntesis de péptidos sustituidos con aminoácidos codificados no naturalmente. Refiérase a, por ejemplo, a A. Forster et al., Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 100:6353 (2003).

5 **[0163]** Sistemas de traducción reconstituidos también pueden ser utilizados. Las mezclas de factores purificados de traducción también han sido usados exitosamente para traducir ARNm a proteínas así como combinaciones de lisados o lisados suplementados con factores purificados de traducción tales como el factor de iniciación – 1 (IF – 1 - initiation factor), (IF-1), IF-2, IF-3 ( $\alpha$  o  $\beta$ ), factor alargado T (EF-Tu), o factores de terminación. Sistemas libres de células también pueden ser agregados a sistemas de traducción / transcripción donde el ADN es introducido al sistema, transcrito al ARNm y éste a su vez es traducido tal como se describió en Current Protocols in Molecular Biology (Protocolos Actuales en Biología Molecular) (F. M. Ausubel et al. editors, Wiley Interscience, 1993). ARN transcrito en un sistema de transcripción eucariota puede estar en la forma de un ARN heteronuclear (hnRNA - heteronuclear RNA) o tapas terminales 5' (guasonina de 7-metilo) y ARNm maduro de cola A de varios extremos 3', que puede ser una ventaja en ciertos sistemas de traducción. Por ejemplo, ARNms son traducidos con una alta eficiencia en el sistema de lisado de reticulocitos.

### 15 **Modificaciones Post - Traducción de los Componentes de Aminoácidos No Naturales de un Polipéptido**

20 **[0164]** Se han desarrollado métodos, composiciones, técnicas y estrategias para incorporar en un lugar específico aminoácidos no naturales durante la traducción in vivo de proteínas. Al incorporar un aminoácido no natural con una química de cadenas laterales que es ortogonal a aquellas de los aminoácidos que ocurren naturalmente, esta tecnología hace posible la derivación de un lugar específico de proteínas recombinantes. Como un resultado, una ventaja principal de los métodos, composiciones, técnicas y estrategias es que las proteínas derivadas pueden prepararse ahora como productos homogéneos definidos.

25 **[0165]** Los polipéptidos de aminoácidos no naturales aquí descritos son útiles para, incluyendo, pero sin limitarse a, nuevas terapias, diagnósticos, enzimas catalíticas, enzimas industriales, proteínas vinculadoras e, incluyendo pero sin limitarse a, el estudio de estructuras y funciones proteínicas. Refiérase, por ejemplo, a Dougherty, (2000) Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology (Aminoácidos No Naturales como Sondas de Estructuras y Funciones Proteínicas, Opinión Actual en Biología Química), 4:645-652. Otros usos para los polipéptidos con aminoácidos no naturales aquí descritos incluyen, sólo en forma de ejemplo, usos que se basan en ensayos, cosméticos, de biología vegetal, medioambientales, de producción de energía y / o militares. Sin embargo, los polipéptidos con aminoácidos no naturales aquí descritos pueden ser sujetos de más modificaciones como para incorporar funcionalidades nuevas o mejoradas, incluyendo la manipulación de la efectividad terapéutica del polipéptido, la mejora del perfil de seguridad del polipéptido, el ajuste de la farmacocinética, farmacología y / o farmacodinámica del polipéptido (por ejemplo, incrementar la solubilidad en agua, la biodisponibilidad, incrementar la vida media sérica, incrementar la vida media terapéutica, modular la inmunogenicidad, modular la actividad biológica, o extender el tiempo de circulación), suministrar funcionalidades adicionales al polipéptido, incorporar un marcador, etiqueta o señal detectable en el polipéptido, facilitar las propiedades de aislamiento del polipéptido, y cualquier combinación de las modificaciones mencionadas.

35 **[0166]** Los métodos, composiciones, estrategias y técnicas aquí descritas no están limitadas a un tipo, clase o familia particular de polipéptidos o proteínas. En efecto, virtualmente cualquier polipéptido puede incluir por lo menos un aminoácido no natural. Una composición podría incluir por lo menos una proteína con por lo menos un, incluyendo, pero sin limitarse a, por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, o por lo menos 10 o más aminoácidos no naturales que han sido modificados post - traducción. Los aminoácidos no naturales modificados post - traducción pueden ser el mismo o diferentes, incluyendo, pero sin limitarse a, pueden existir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 o más lugares diferentes en la proteína que contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 o más aminoácidos diferentes no naturales modificados post - traducción. Una composición puede incluir una proteína con por lo menos un aminoácido modificado, pero menos que todos, de aminoácidos presentes en la proteína, y que han sido sustituidos con aminoácidos no naturales modificados post - traducción. Para cualquier proteína con más de un aminoácido no natural modificado post - traducción, los aminoácidos no naturales modificados post - traducción pueden ser idénticos o diferentes (incluyendo, pero sin limitarse a, la proteína puede incluir dos o más tipos diferentes de aminoácidos no naturales modificados post - traducción, o puede incluir dos aminoácidos no naturales modificados post - traducción del mismo tipo). Para cualquier proteína con más de dos aminoácidos no naturales modificados post - traducción, los aminoácidos no naturales modificados post - traducción pueden ser el mismo, diferentes o una combinación de varios aminoácidos no naturales modificados post - traducción del mismo tipo con por lo menos un aminoácido no natural modificado post - traducción diferente.

40 **[0167]** Por ejemplo, la modificación post - traducción puede ser hecha por medio de una reacción nucleófila – electrofílica. La mayoría de reacciones utilizadas covalentemente para la modificación selectiva de proteínas involucran la formación de enlaces covalentes entre compañeros de reacción nucleófilos y electrofílicos, incluyendo, pero sin limitarse a la reacción de halocetonas  $\alpha$  con cadenas laterales de histidina o cisteína. La selectividad en estos casos es determinada por el número y la accesibilidad de los residuos nucleofílicos en la proteína. En las proteínas del invento, otras reacciones selectivas adicionales pueden ser utilizadas tales como la reacción de un

aminoácido ceto no natural con hidrazidas o compuestos aminoóxi, in vitro o in vivo. Refiérase, por ejemplo, a Cornish, et al., (1996) J. Am. Chem. Soc., 118:8150-8151; Mahal, et al., (1997) Science (Ciencias), 276:1125-1128; Wang, et al., (2001) Science (Ciencia) 292:498-500; Chin, et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027; Chin, et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99:11020-11024; Wang, et al., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100:56-61; Zhang, et al., (2003) Biochemistry (Bioquímica), 42:6735-6746; y, Chin, et al., (2003) Science (Ciencia), 301:964-7. Esto permite la marcación selectiva de virtualmente cualquier proteína en un anfitrión de reactivos incluyendo fluoróforos, agentes reticulantes, derivados de sacáridos y moléculas citóxicas. Refiérase también, a la patente de Estados Unidos número 6,927,042 titulada "Glycoprotein synthesis" ("Síntesis de Glicoproteínas").

#### 10 **A. Modificaciones de componentes de aminoácidos no naturales**

[0168] Las varias modificaciones de componentes de aminoácidos no naturales (que incluyen aminoácidos no naturales, así como porciones con aminoácidos no naturales de un polipéptido u otro polímero) incluyen, pero no se limitan a,

- 15 (I) reacciones de componentes de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo con reactivos que contienen hidroxilamina para formar componentes de aminoácidos no naturales que contienen oxima;
- 20 (II) Reacciones de componentes con aminoácidos no naturales que contienen hidroxilamina con reactivos que contienen carbonilo para formar componentes con aminoácidos no naturales que contienen oxima;
- 25 (III) Reacciones de componentes con aminoácidos no naturales que contienen oxima, formados para la reacción de carbonilos e hidroxilaminas como en (I) e (II), con diferentes reactivos que contienen carbonilo para formar nuevos componentes con aminoácidos no naturales que contienen oxima por medio de una reacción de intercambio de oximas;
- 30 (IV) reacciones de componentes con aminoácidos no naturales que contienen dicarbonilo con reactivos que contienen hidroxilamina para formar componentes con aminoácidos no naturales que contienen oxima;
- 35 (V) Reacciones de componentes con aminoácidos no naturales que contienen oximas con reactivos que contienen dicarbonilos para formar componentes con aminoácidos no naturales que contienen oximas;
- 40 (VI) Reacciones de componentes de aminoácidos no naturales que contienen oximas, formados por medio de reacciones de dicarbonilos e hidroxilaminas tal como en (iv) y (v), con reactivos diferentes que contienen dicarbonilo para formar componentes nuevos de aminoácidos no naturales que contienen oximas por medio de una reacción de intercambio de oximas.

[0169] Aquellas reacciones son mostradas en la figura 2 donde la funcionalidad del aminoácido (A), incorporada en forma de traducción (o incorporada de otra forma) al polipéptido, reacciona con el reactivo (B) para generar polipéptido modificado. Aquellas reacciones pueden ocurrir además con la funcionalidad del aminoácido (A) en un polímero (incluyendo, en forma de ejemplo, un polinucleótido, un polinucleósido, un polisacárido, o sus combinaciones), donde la reacción con el reactivo (B) genera un polímero modificado. Para conveniencia, las modificaciones descritas en esta sección y en otras partes de este documento utilizan "polipéptido" o "polipéptidos", en forma de ejemplo, para ilustrar las varias modificaciones. Sin embargo, las modificaciones aquí descritas aplican igualmente también para aminoácidos no naturales incorporados en otras moléculas, incluyendo, pero sin limitarse a, polinucleótidos, polinucleósidos, polisacáridos, polímeros sintéticos, o sus combinaciones.

[0170] El término "componentes", como se describe en este documento, se refiere a los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polímeros que contienen aminoácidos no naturales, secuencias de ácidos nucleicos que contienen codones electores, polipéptidos de aminoácidos no naturales vinculados a polímeros, polipéptidos de aminoácidos no naturales vinculados a polímeros que contienen aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales vinculados a secuencias de ácidos nucleicos, polipéptidos de aminoácidos no naturales vinculados a secuencias de ácidos nucleicos; donde cada uno de los cuales puede ser independientemente una parte de, o incorporado a, un polipéptido, un polipéptidos de aminoácidos no naturales, una secuencia de ácido nucleico, o un polímero.

[0171] La descripción de estos varios esquemas de reacción han sido presentados en las aplicaciones de patentes provisionales de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068.

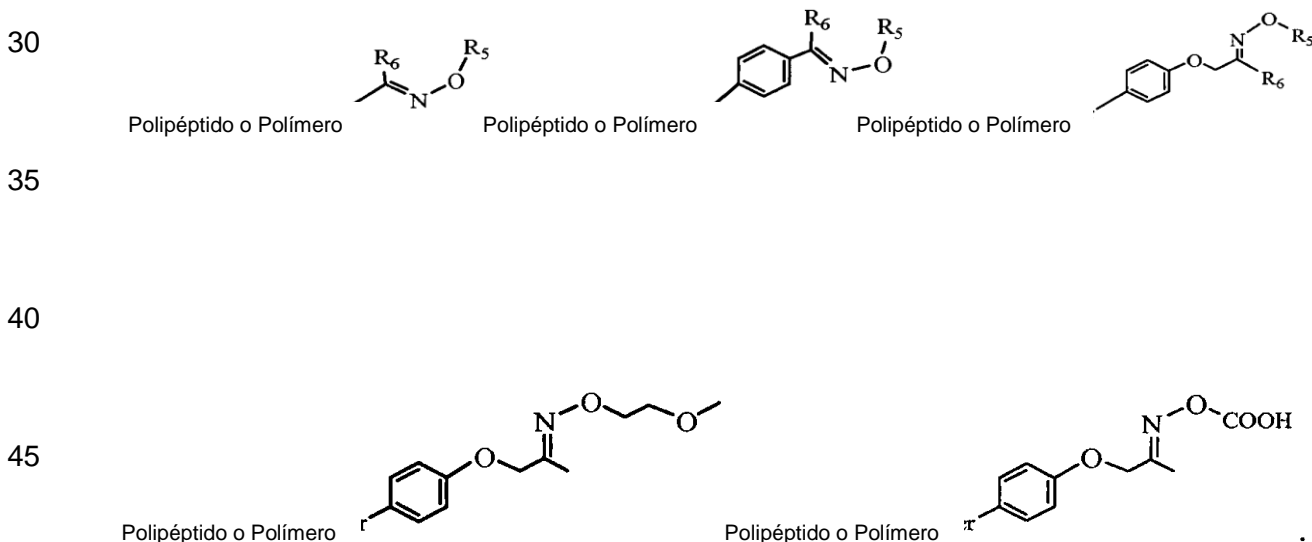
Reacciones de componentes de aminoácidos no naturales que contienen Carbonilo con reactivos que contienen Hidroxilaminas para formar componentes de aminoácidos no naturales que contienen Oximas.

5 [0172] Aminoácidos no naturales con cadenas laterales que contienen electrófilos incluyendo, pero sin limitarse a, grupos carbonilos tales como aldehídos, ésteres, tioésteres y cetonas, pueden ser incorporados a polipéptidos. La incorporación de aquellos aminoácidos no naturales con cadenas laterales electrofílicas hacen posible la derivación en lugares específicos de esta cadena lateral por medio de un ataque nucleófilo del grupo de carbonilos. Cuando el nucleófilo atacante es una hidroxilamina, un polipéptido derivado de oximas será generado. Los métodos para derivar y / o para modificar aún más pueden ser realizados con un polipéptido que ha sido purificado antes del paso de derivación o después del paso de derivación. Además, el paso de derivación puede ocurrir bajo condiciones moderadamente ácidas o ligeramente básicas, incluyendo, en forma de ejemplo, entre un pH de alrededor de dos a 10, o entre un pH de alrededor de dos a ocho o entre un pH de alrededor de cuatro a ocho.

15 [0173] La modificación de las cadenas laterales de carbonilos, de aminoácidos no naturales incorporados a polipéptidos, con reactivos que contienen hidroxilamina u otros grupos funcionales con reactividad química similar pueden soportar polipéptidos modificados que contienen enlaces de oxima. Las reacciones y las estructuras resultantes de aquellos polipéptidos modificados se muestran en la figura 3.

20 [0174] Ciertas secciones aquí descritas son polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales con cadenas laterales que contienen un grupo de oximas en otras secciones, aquellos grupos de oximas pueden ser modificados aún más, así como, en forma de ejemplo solamente de, la formación de grupos de oximas enmascarados (que pueden ser convertidos fácilmente en grupos de oximas), grupos de oximas protegidos (que pueden ser desprotegidos fácilmente de para convertirse en grupos de oximas disponibles para otras reacciones químicas), o nuevos grupos de oximas por medio de reacciones de intercambios de oximas.

25 [0175] Ejemplos no limitantes de aquellos enlaces de oximas de polipéptidos modificados se muestran a continuación:



Reacciones de componentes de aminoácidos no naturales que contienen Hidroxilaminas con reactivos que contienen carboxilos para formar componentes aminoácidos no naturales que contienen Oximas

55 [0176] La incorporación de aminoácidos no naturales que contienen grupos de hidroxilamina en polipéptidos permite una reacción con una variedad de grupos electrofílicos incluyendo, pero sin limitarse a, grupos carbonilos tales como cetonas, ésteres, tioésteres y aldehídos. La nucleofilicidad del grupo de hidroxilaminas le permite reaccionar eficientemente y selectivamente con una variedad de moléculas que contienen funcionalidades de carbonilos, u otros grupos funcionales con una reactividad química similar, bajo condiciones moderadas en una solución acuosa para formar el enlace de oxima correspondiente. Esta derivación en un lugar específico y / o modificación adicional de estas cadenas laterales por medio de un ataque nucleofílico del grupo de carbonilos pueden realizarse con un polipéptido que ha sido purificado antes del paso de derivación o después del paso de derivación. Además, el paso de derivación puede ocurrir bajo condiciones moderadamente ácidas o ligeramente básicas, incluyendo en forma de ejemplo, entre un pH de alrededor de dos a 10, un pH de alrededor de dos a ocho o entre un pH de alrededor de 4 a ocho.

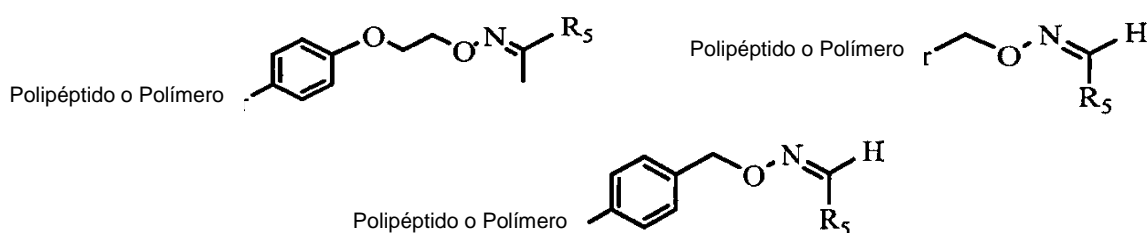
60

65

[0177] La modificación de los grupos de hidroxilaminas de aminoácidos no naturales incorporados a polipéptidos con reactivos que contienen carbonilos permiten enlaces de oxima que contienen polipéptidos modificados. Las reacciones y las estructuras resultantes de aquellos polipéptidos modificados se muestran en la figura cuatro.

[0178] Ciertas secciones aquí descritas son polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales con cadenas laterales que contienen un grupo de oximas. En otras secciones aquellos grupos de oximas pueden ser modificados aún más, de tal forma que, en forma de ejemplo solamente, la formación de grupos enmascarados de oximas (que se pueden convertir fácilmente de a grupos de oximas), grupos protegidos de oximas (que con una desprotección pueden ser convertidos fácilmente en grupos de oximas disponibles para otras reacciones químicas) o nuevos grupos de oximas por medio de reacciones de intercambios de oximas.

[0179] Ejemplos no limitantes de aquellos enlaces de oximas de polipéptidos modificados se muestran a continuación:



Las Reacciones De Los Componentes De Aminoácidos No Naturales Que Contienen Oximas Formados Por Medio De La Reacción De Carbonilos E Hidrolaminas, Con Diferentes Reactivos Que Con Tienen Carbonilos Para Formar Nuevos Componentes De Aminoácidos No Naturales Que Contienen Oximas Por Medio De Una Reacción De Intercambio De Oximas

[0180] Aminoácidos no naturales que contienen un grupo de oximas que permiten la reacción con una variedad de reactivos que contienen grupos reactivos de carbonilos (incluyendo, pero sin limitarse a, aldehídos, ésteres, tioésteres y cetonas) para formar nuevos aminoácidos no naturales (que pueden ser incorporados a un polipéptido) que comprenden un nuevo grupo de oximas. Tal reacción de intercambio permite una mayor funcionarización de los polipéptidos de aminoácidos no naturales.

[0181] Modificación de cadenas laterales de oximas, de aminoácidos no naturales incorporados a polipéptidos, con reactivos que contienen carbonilos, u otros grupos funcionales con una reactividad química similar, hace que sean posibles polipéptidos modificados con nuevos enlaces de oximas. Las reacciones en las estructuras resultantes de aquellos polipéptidos modificados se muestran en la FIG. 5.

[0182] Ciertas secciones aquí descritas son polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales con cadenas laterales que contienen un grupo de oximas. En otras secciones aquellos grupos de oximas pueden ser modificados aún más, de tal forma que, en forma de ejemplo únicamente, se puede realizar la formación de grupos enmascarados de oximas (que puede convertirse fácilmente a grupos de oximas), grupos protegidos de oximas (que con una desprotección pueden ser convertidos fácilmente a grupos de oximas que estarían disponibles para otras reacciones químicas), o nuevos grupos de oximas por medio de reacciones de intercambios de oximas.

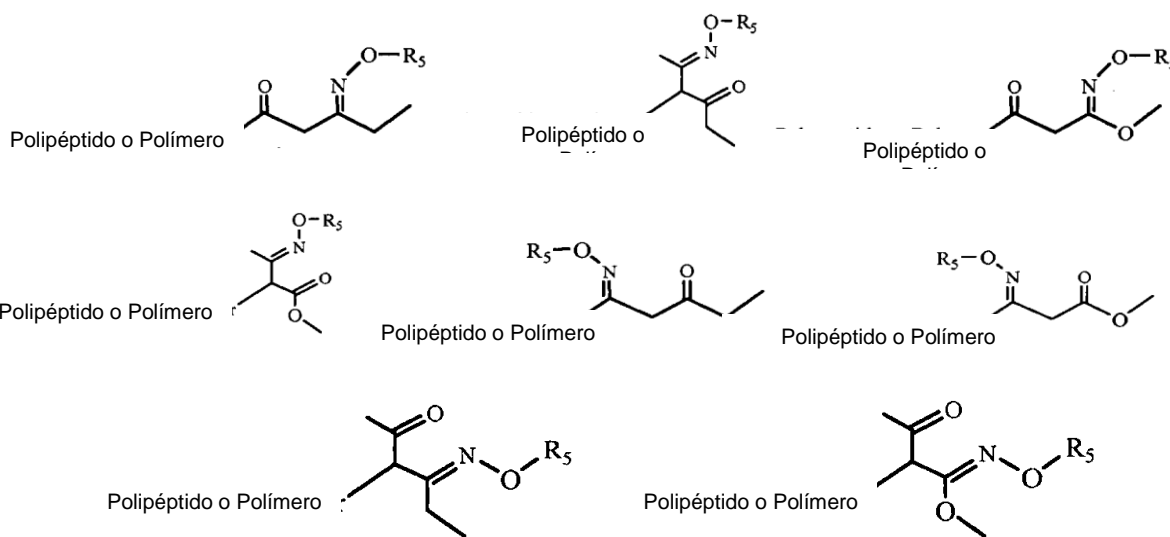
Reacciones de Componentes de Aminoácidos No Naturales que contienen Dicarbonilos con Reactivos que contienen Hidroxilaminas para formar Oximas

[0183] Los aminoácidos no naturales con cadenas laterales que contienen electrófilos incluyendo, pero sin limitarse a grupos de dicarbonilos tales como un grupo de dicetonas, un grupo de cetoaldehído, un grupo de cetoácidos, un grupo de cetoésteres, y un grupo de cetotioésteres), un grupo similar a dicarbonilos (que tiene una reactividad similar a un grupo de dicarbonilos y estructuralmente similar a un grupo de carbonilos), un grupo enmascarado de dicarbonilos (que puede ser convertidos fácilmente a un grupo de dicarbonilos), o un grupo protegido de dicarbonilos (que tiene una reactividad similar a un grupo de dicarbonilos cuando se realiza la desprotección), pueden ser incorporados a polipéptidos. La incorporación de aquellos aminoácidos no naturales con aquellas cadenas electrofílicas a pilipéptidos hace que sea posible la derivación en lugares específicos de esta cadena lateral por medio de un ataque nucleófilo del grupo de carbonilos. Cuando el nucleófilo atacante es una hidroxilamina, un polipéptido derivado de oximas será generado. Los métodos para derivar y / o modificar en mayor forma pueden ser realizados con un polipéptido que ha sido purificado antes del paso de derivación o después del paso de derivación. Además, el paso de derivación puede ocurrir bajo condiciones moderadamente ácidas o ligeramente básicas, incluyendo, en forma de ejemplo, entre un pH de alrededor de dos a 10, un pH de alrededor de dos a ocho, o entre un pH de alrededor de cuatro a ocho.

**[0184]** Una modificación de las cadenas laterales de dicarbonilos, de aminoácidos no naturales incorporados a polipéptidos, con reactivos que contienen hidroxilamina, u otros grupos funcionales con una reactividad química similar, es compatible con polipéptidos modificados que contienen enlaces de oximas. Las reacciones y las estructuras resultantes de aquellos polipéptidos modificados se muestran en la figura seis.

**[0185]** Ciertas secciones aquí descritas son polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales con cadenas laterales que contienen un grupo de oximas. En otras secciones tales grupos de oximas pueden ser modificados aún más, de tal forma, que en forma de ejemplo solamente, se puede producir la formación de grupos enmascarados de oximas (que pueden ser convertidos fácilmente a grupos de oximas), grupos protegidos de oximas (que con una desprotección pueden ser convertidos fácilmente en grupos de oximas para otras reacciones químicas), o nuevos grupos de oximas por medio de reacciones de intercambios de oximas.

**[0186]** Ejemplos no limitantes de aquellos enlaces de oximas de polipéptidos modificados se muestran a continuación:



Reacciones de Componentes de Aminoácidos No Naturales que Contienen Hidroxilamina con Reactivos que contienen Dicarbonilo para formar Oximas

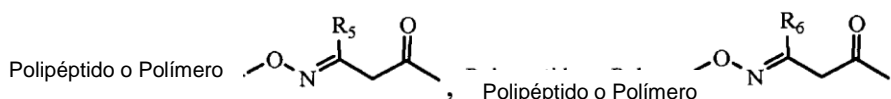
**[0187]** La incorporación de aminoácidos no naturales que contienen grupos de hidroxilaminas en polipéptidos es compatible con una reacción en una variedad de grupos electrofílicos incluyendo, pero sin limitarse a, grupos de dicarbonilos tales como un grupo de dicetonas, un grupo de cetoaldehídos, un grupo de cetoácidos, un grupo de cetoésteres, y un grupo de cetotioésteres, un grupo similar a los dicarbonilos (que tiene una reactividad similar a un grupo de dicarbonilos y es estructuralmente similar a un grupo de carbonilos), un grupo enmascarado de dicarbonilos (que puede ser convertido fácilmente a un grupo de dicarbonilos), o un grupo protegido de dicarbonilos (que tiene una reactividad similar a un grupo de dicarbonilos con una desprotección). La nucleofilicidad del grupo de hidroxilaminas le permite reaccionar eficientemente y selectivamente con una variedad de moléculas que contienen aquella funcionalidad de dicarbonilos, u otros grupos funcionales con una reactividad química similar, bajo condiciones moderadas en soluciones acuosas para formar el enlace correspondiente de oximas. Esta derivación en lugares específicos y / o mayor modificación de estas cadenas laterales por medio de un ataque nucleofílico del grupo de dicarbonilos puede ser realizado por medio de un polipéptido que ha sido purificado antes del paso de derivación o después del paso de derivación. Además, el paso de derivación puede ocurrir en condiciones moderadamente ácidas o ligeramente básicas, incluyendo, en forma de ejemplo, entre un pH de alrededor de dos a 10, un pH de alrededor de dos a ocho y entre un pH de alrededor de cuatro a ocho.

**[0188]** La modificación de los grupos de hidroxilaminas de aminoácidos no naturales incorporados a polipéptidos, con reactivos y contienen dicarbonilos hacen posible que existan los polipéptidos modificados que contienen enlaces de oximas. Las reacciones y las estructuras resultantes de aquellos polipéptido modificados se muestran en la figura siete.

**[0189]** Ciertas secciones aquí descritas son polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales con cadenas laterales que contienen a un grupo de oximas. En otras secciones aquellos grupos de oximas puede ser modificados aún más, de tal forma que, en forma de ejemplo solamente, se puede realizar la formación de grupos enmascarados de oximas (que se pueden convertir fácilmente a grupos de oximas), grupos protegidos de oximas (que con una

desprotección pueden ser convertidos fácilmente a grupos de oximas disponibles para otras reacciones químicas), o nuevos grupos de oximas por medio de reacciones de intercambio.

[0190] Ejemplos no limitantes de aquellos enlaces de oximas de polipéptidos modificados se muestran a continuación:



Las reacciones de componentes de aminoácidos no naturales que contienen oximas formados por medio de la reacción de dicarbonilos e hidroxilaminas, con carbonilos o reactivos diferentes que contienen carbonilos por medio de una reacción de intercambio de nuevas Oximas

[0191] Los aminoácidos no naturales que contienen un grupo o de oximas hacen posible la reacción con una variedad de reactivos que contienen ciertos grupos reactivos de dicarbonilos, incluyendo, pero sin limitarse a, grupos de dicetonas, grupos de cetoaldehídos, grupos de cetoácidos, grupos de cetoésteres, grupos de cetioésteres, grupos similares a los de dicarbonilos (que tienen una reactividad similar a un grupo de dicarbonilos y es estructuralmente similar a un grupo de carbonilos), grupos enmascarados de dicarbonilos (que puede ser convertidos fácilmente a un grupo de dicarbonilos), o grupos protegidos de dicarbonilos (que pueden ser relativamente similares a un grupo de dicarbonilos en el momento de desprotección) para formar aminoácidos nuevos no naturales (que pueden ser incorporados al polipéptido) incluyendo un nuevo grupo de oximas. Tal reacción de intercambio de oximas hace posible una mayor funcionarización de los polipéptidos de aminoácidos no naturales.

[0192] Una modificación de aquellas cadenas laterales de oximas, de aminoácidos no naturales incorporados a polipéptidos, con reactivos que contienen dicarbonilos, u otros grupos funcionales con una reactividad química similar, hace posible que existan nuevos enlaces de oximas que contienen polipéptidos modificados. Las reacciones y las estructuras resultantes de aquellos polipéptidos modificados se muestran en la figura 8.

[0193] Ciertas secciones aquí descritas son polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales con cadenas laterales que contienen un grupo de oximas. En otras secciones tales grupos de oximas puede ser modificados aún más, de tal manera, en forma de ejemplo solamente, que se puede realizar la formación de grupos enmascarados de oximas (los cuales pueden ser convertidos fácilmente en grupos de oximas), grupos protegidos de oximas (los cuales por medio de desprotección pueden ser convertidos fácilmente en grupos de oximas disponibles para otras reacciones químicas), o nuevos grupos de oximas por medio de reacciones de intercambio de oximas.

#### **B. Mejorando la Afinidad para la Albúmina Sérica**

[0194] Varias moléculas también pueden ser fusionadas a los polipéptidos de aminoácidos no naturales aquí descritos para modular la vida media en sueros. En algunos casos, las moléculas son enlazadas o fusionadas a los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) aquí descritos para mejorar la afinidad para la albúmina sérica endógena en un animal.

[0195] Por ejemplo, en algunos casos, una fusión recombinante de un polipéptido y una secuencia de enlace de albúmina son realizadas. En otros casos, los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) aquí descritos son acilados con ácidos grasos. En otros casos, los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) aquí descritos son fusionados directamente con albúmina sérica (incluyendo, pero sin limitarse a, albúmina sérica humana). Aquellas personas con conocimiento en la industria reconocerán que una amplia gama de otras moléculas también pueden ser enlazadas a polipéptidos aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, tal como se describe en este documento, para modular los enlaces a albúmina sérica u otros componentes séricos. Una mayor discusión al respecto de la mejora de afinidad para la albúmina sérica es descrita en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; la publicación PCT WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos").

#### **C. Glicosilación de los polipéptidos de aminoácidos no naturales aquí descritos**

[0196] Los métodos y composiciones aquí descritos incluyen a polipéptidos que incorporan a uno o más aminoácidos no naturales que contienen residuos de sacáridos. Los residuos sacáridos pueden ser naturales (incluyendo, pero sin limitarse a, N-acetilglucosamina) o no naturales (incluyendo, pero sin limitarse a, 3-fluorogalactosa). Los sacáridos pueden ser enlazados a aminoácidos no naturales por medio de un enlace

glucosídico enlazado con O (incluyendo, pero sin limitarse a, N-acetilgalactosa-L-serina) o un enlace no natural (incluyendo, pero sin limitarse a, una oxima o el correspondiente glucósido enlazado con C o S).

5 [0197] Las fracciones de sacáridos (incluyendo, pero sin limitarse a, glicosil) pueden ser agregadas a los polipéptidos de aminoácidos no naturales ya sea in vivo o in vitro. En algunos casos, un polipéptido que contiene un aminoácido no natural que contiene carbonilos es modificado con un sacárido derivado de un grupo de aminoxis para generar el correspondiente polipéptido glicosilado enlazado por medio de un enlace de oximas. Una vez adherido al aminoácido no natural, el sacárido puede ser elaborado aún más por medio de tratamiento con glucosiltransferasas y otras enzimas para generar un enlace oligosacárido al polipéptido de aminoácidos no naturales. Refiérase, por ejemplo, a H. Liu, et al. J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003).

#### **D. Uso de grupos de enlace y aplicaciones, incluyendo dímeros y multímeros de polipéptidos**

15 [0198] Adicionalmente a agregar funcionalidad directamente al polipéptido de aminoácidos no naturales, la porción de aminoácidos no naturales del polipéptido puede ser modificada primero por medio de una molécula enlazadora multifuncional (por ejemplo, bi, tri, tetra) que subsecuentemente es modificada aún más. Es decir, por lo menos un extremo de la molécula enlazadora multifuncional reacciona con lo menos un aminoácido natural en un polipéptido y por lo menos otro extremo del enlace multifuncional está disponible para tener funcionalizaciones adicionales. Si todos los extremos del enlace multifuncional son idénticos, entonces (dependiendo en las condiciones stoichiometricas) homomultímeros del polipéptido de aminoácidos naturales pueden formarse. Si los extremos del enlace multifuncional tienen diferentes reactividades químicas, entonces por lo menos un extremo del grupo O enlazado multifuncional estará atado al polipéptido de aminoácidos naturales y el otro extremo podrá reaccionar con una funcionalidad diferente, incluyendo, en forma de ejemplo solamente: una marcación, un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de un polietilenglicol; un foto reticulante; un compuesto citotóxico; un medicamento; una etiqueta de afinidad; un marcador de foto afinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un poli nucleótido anti-sentido; un sacárido; un dendrímero soluble en agua; una ciclodextrina; un ácido nucleico inhibidor; un biomaterial; una partícula nano; un marcador de espín; un fluoróforo; una fracción que contiene metales; una fracción photocaged (fotoencerrada); una fracción excitable actínica; una fracción fotoisomerizable; una biotina; un análogo de biotina; una fracción que contiene un átomo pesado; un grupo químicamente divisible; un grupo foto divisible; una cadena lateral alargada, un azúcar ligado a carbonos; un agente redox - activo; un amino tioácido; una fracción tóxica, una fracción isotópicamente marcada y, una sonda biofísica, un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un reactivo transmisor de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; una molécula pequeña; un punto cuántico; un transmisor nano; y una combinación de todo lo anterior.

35 [0199] Un mayor uso y aplicaciones de los grupos enlazadores, incluyendo dímeros y multímeros de polipéptidos son descritos en mayor detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; la publicación PCT WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos").

#### **E. Ejemplo de aumento o de funcionalidad: facilitación de las propiedades de aislamiento de un polipéptido**

45 [0200] Un polipéptido de aminoácidos ocurren naturalmente o que no ocurren naturalmente puede ser difícil de aislar de una muestra por varias razones, incluyendo, pero sin limitarse a, la solubilidad o características de enlace del polipéptido. Por ejemplo, en la preparación de un polipéptido para usos terapéuticos, aquel polipéptido podría ser aislado de un sistema recombinante que ha sido diseñado para sobre producir el polipéptido. Sin embargo, debido a las características de solubilidad o de enlace del polipéptido, alcanzar el nivel deseado de pureza a menudo suele ser difícil. Los métodos, composiciones, técnicas y estrategias se describen en mayor detalle en las aplicaciones de patentes de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; la publicación PCT WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos") suministra una solución para esta situación.

#### **F. Ejemplo de aumento de funcionalidad de detección: de la presencia de un polipéptido**

55 [0201] Un polipéptido de aminoácidos que ocurren naturalmente o no naturales pueden ser difíciles de detectar en una muestra (incluyendo una muestra in vivo e in vitro) debido a varias razones, incluyendo, pero sin darse a, la falta de un reactivo o marcador que se pueda enlazar fácilmente al polipéptido. Los métodos, composiciones, técnicas y estrategias están descritas en mayor detalle en las aplicaciones de patente es de Estados Unidos números 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; la publicación PCT WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos"), ofrecen una solución para esta situación.

65



**G. Ejemplo de aumento de funcionalidad: mejora de las propiedades terapéuticas de un polipéptido**

5 [0202] Un polipéptido de aminoácidos que ocurren naturalmente o no naturales podrán suministrar un cierto beneficio terapéutico a un paciente con una enfermedad, trastorno o condición particular. Aquel beneficio terapéutico  
 10 dependerá de varios factores, incluyendo, en forma de ejemplo solamente, de: el perfil de seguridad del polipéptido, y la farmacocinética, farmacología y / o farmacodinámica del polipéptido (por ejemplo, solubilidad en agua, biodisponibilidad, vida media sérica, vida media terapéutica, inmunogenicidad, actividad biológica, tiempo de  
 15 circulación). Adicionalmente, podría ser ventajoso el suministrar funcionalidades adicionales al polipéptido, tal como un compuesto o medicamento citotóxico adjunto, o podría ser deseable el adherir polipéptidos adicionales para formar los homomultímeros o heteromultímeros aquí descritos. Aquellas modificaciones, preferiblemente, no destruyen la actividad y / o estructura terciaria del polipéptido original. Los métodos, composiciones, técnicas y estrategias se describen en mayor detalle en las aplicaciones de patente de Estados Unidos números: 60/638,418, 60/638,527, 60/639,195, 60/696,210, 60/696,302, y 60/696,068; la publicación PCT WO 05/074650 titulada "Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses" ("Polipéptidos de Paquetes de Cuatro Hélices Modificados y sus Usos"), suministra soluciones para estos asuntos.

**X. Usos terapéuticos de los polipéptidos modificados**

20 [0203] Los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) aquí descritos, incluyendo sus homo- y heteromultímeros tienen usos múltiples incluyendo, pero sin limitarse a: usos terapéuticos, diagnósticos, que se basan en ensayos, cosméticos, de biología vegetal, medio ambientales, de producción energética, y / o militares. En forma de una ilustración no limitante, los siguientes usos terapéuticos de polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) son suministrados.

25 [0204] Los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) aquí descritos son útiles para tratar una amplia gama de trastornos. La administración de los productos de polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) aquí descritos resulta en cualquiera de las unidades demostradas por preparaciones de polipéptidos comercialmente disponibles en humanos. Cantidades promedio de los productos de polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) podrían variar y se debería basar específicamente en las recomendaciones y prescripción de un  
 30 médico calificado. El monto exacto del polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) depende de la preferencia sujeta a factores tales como el tipo exacto de la condición que está siendo tratada, la condición del paciente que está siendo tratado, así como otros ingredientes de la composición. El monto que va a ser administrado podría ser determinado fácilmente por una persona con conocimientos en la industria que se basa en la terapia con el polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados).

**A. Administración y composiciones farmacéuticas**

35 [0205] Los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, tal como se describen aquí (incluyendo, pero sin limitarse a, sintetasas, proteínas que comprenden uno o más aminoácidos no naturales, etcétera) son utilizados opcionalmente para usos terapéuticos, incluyendo, pero sin limitarse a, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Aquellas composiciones, por ejemplo, comprenden un monto terapéuticamente efectivo de los polipéptidos de aminoácidos naturales, modificados o no modificados, tal como se describe aquí, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Aquel portador o excipiente incluye, pero no se limita a, soluciones salinas, amortiguadores salinos, dextrosa, agua, glicerol, etanol y / o sus combinaciones. La formulación está hecha para adaptarse a la modalidad de administración. En general, métodos para administrar proteínas son muy conocidos en la industria y pueden aplicarse a la administración de polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, tal como se describe en este documento.

40 [0206] Las composiciones terapéuticas que contienen uno o más de los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, tal como se describen en este documento son probados opcionalmente en uno o más modelos animales in vivo o in vitro de la enfermedad, para confirmar la eficacia, el metabolismo del tejido y para  
 45 estimar la dosis, de acuerdo a los métodos bien conocidos para aquellas personas que tienen experiencia normal en la industria. Particularmente, las dosis pueden ser determinadas inicialmente por medio de medidas de actividad, estabilidad o de otro tipo de homólogos de aminoácidos no naturales o naturales (incluyendo, pero sin limitarse a, la comparación de un polipéptido (modificado) para que incluya uno o más aminoácidos no naturales a un polipéptido de aminoácidos no naturales), es decir, un ensayo relevante.

50 [0207] La administración es por medio de cualquiera de las rutas usadas normalmente para introducir una molécula en contacto efectivo con las células sanguíneas o del tejido. Los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, como se describen en este documento, son administrados en cualquier forma compatible, opcionalmente con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Métodos adecuados para la  
 55 administración de los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, tal como se describe aquí, a un paciente son disponibles, y, aunque se puede utilizar más de una ruta para administrar una composición específica, una ruta en particular puede, a menudo, suministrar una acción o reacción más inmediata y efectiva que otras rutas.

5 [0208] Los portadores farmacéuticamente aceptables son determinados en parte por la composición específica que está siendo administrada, así como por el método particular utilizado para administrar la composición. Asimismo, existe una amplia gama de formulaciones adecuadas de las composiciones farmacéuticas aquí descritas.

10 [0209] Los polipéptidos de aminoácidos no naturales pueden ser administrados por cualquier ruta convencional adecuada para las proteínas o péptidos, incluyendo, pero sin limitarse a parenteralmente, por ejemplo, inyecciones incluyendo, pero sin limitarse a, subcutáneamente o intravenosamente o cualquier otra forma de inyecciones o infusiones. Las composiciones de polipéptidos (incluyendo los varios polipéptidos aquí descritos) pueden administrarse por varias rutas incluyendo, pero sin limitarse a, medios orales, intravenosos, intra - peritoneales, intramusculares, transdérmicos, subcutáneos, tópicos, sublinguales, o rectales. Composiciones que contiene polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, tal como se los describe aquí, también pueden ser administrados por medio de liposomas. Aquellas rutas de administración y formulaciones apropiadas son generalmente conocidas para personas con conocimiento en la industria. El polipéptido de aminoácidos no naturales puede ser utilizado sólo o en combinación con otros componentes adecuados tales como un portador farmacéutico.

20 [0210] Los polipéptidos de aminoácidos naturales, modificados o no modificados, tal como se describe en este documento, solos o en combinación con otros componentes adecuados, también puede ser hechos como formulaciones de aerosol (es decir, pueden ser "nebulizados") para hacer administrados por medio de inhalación. Las formulaciones de aerosol pueden ser colocadas en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

25 [0211] Formulaciones adecuadas para su administración parenteral, tales como; por ejemplo, por medio de rutas intraarticulares (en las articulaciones), intravenosas, intramusculares, intradérmicas, intraperitoneales y subcutáneas, incluyen soluciones de inyecciones estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bactericidas, y solutos que mantienen al isotónico de la formulación con la sangre del recipiente deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que suelen incluir agentes suspensores, solubilizantes, agentes espesantes y conservantes. Las formulaciones empacadas de ácido nucleico pueden ser presentadas en contenedores sellados de dosis unitarias o múltiples, tales como ampollas y viales.

30 [0212] La administración parenteral e intravenosa son los métodos preferidos de administración. En particular, las rutas de administración que ya están en uso para terapias homólogas de aminoácidos naturales (incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos usados típicamente por EPO, IFN, GM-CSF, IFNs, interleucinas, anticuerpos y / o cualquier otra proteína entregada farmacéuticamente), junto con las formulaciones de uso actual, suministra las rutas preferidas de administración y formulación para los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, tal como se los describe en este documento.

35 [0213] La dosis administrada a un paciente, de las composiciones y métodos aquí descritos, es suficiente para tener una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente durante un período de tiempo. La dosis es determinada por la eficacia de la formulación particular, y la actividad, estabilidad o vida media del suero de los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, utilizados y la condición del paciente, así como la masa corporal o área de superficie del paciente que está siendo tratado. El tamaño de la dosis también es determinada por la existencia, naturaleza y magnitud de cualquier efecto colateral adverso que acompañe la administración de una formulación particular, o similares en un paciente específico.

40 [0214] Al determinar el monto efectivo de la formulación que debe ser administrada en el tratamiento o profilaxis de la enfermedad (incluyendo, pero sin limitarse a, cánceres, enfermedades hereditarias, diabetes, sida, o similares), el médico evalúa los niveles de plasma circulante de las toxicidades de la formulación, el progreso de la enfermedad y / o, en casos relevantes, la producción de anti cuerpos anti-polipéptidos de aminoácidos no naturales.

45 [0215] La dosis administrada, por ejemplo, a un paciente de 70 kilogramos, está típicamente en el rango equivalente de a las dosis de proteínas terapéuticas usadas actualmente, ajustadas para la actividad o vida media sérica alterada de la composición relevante. Las formulaciones farmacéuticas aquí descritas pueden suplementar las condiciones de tratamiento de cualquier terapia convencional conocida, incluyendo la administración de anticuerpos, la administración de vacunas, la administración de agentes citotóxicos, polipéptidos de aminoácidos naturales, ácidos nucleicos, análogos de nucleótidos, modificadores de respuestas biológicas, y similares.

50 [0216] Para la administración, las formulaciones farmacéuticas aquí descritas son administradas a una tasa determinada por la LD-50 o la ED-50 de la formulación relevante, y / u observación de cualquier efecto colateral de los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, en varias concentraciones, incluyendo, pero sin limitarse a, tal como sea adecuado de acuerdo a la masa y salud general del paciente. La administración puede ser lograda por medio de una sola dosis o varias dosis divididas.

55 [0217] Si un paciente que está siendo expuesto a la infusión de una formulación desarrolla fiebres, escalofríos o dolores musculares, él / ella recibe la dosis apropiada de aspirina, ibuprofeno acetaminofeno u otro medicamento

que controle el dolor / la fiebre. Pacientes que experimentan reacciones a la infusión tales como la fiebre, dolores musculares y escalofríos son pre - medicados 30 min antes a las futuras unciones ya sea con aspirina, acetaminofeno o, incluyendo, pero sin limitarse a, difenhidramina. La meperidina es utilizada para escalofríos y dolores musculares más severos que no responden rápidamente de antipiréticos y antihistamínicos. La infusión celular es desacelerada o descontinuada dependiendo en la severidad de la reacción.

**[0218]** Los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, tales como se los describe en este documento, pueden ser administrados directamente en un sujeto mamífero. La administración es por medio de cualquier ruta usada normalmente para introducir un polipéptido a un sujeto. Los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, tales como se describe aquí, incluyen aquellas administraciones por vías orales, rectales, tópicas, por inhalación (incluyendo, pero sin limitarse a, por medio de un aerosol), bucales (incluyendo, pero sin limitarse a, sublinguales), vaginales, parenterales (incluyendo, pero sin limitarse a, subcutáneos, intramusculares, intradérmicos, intraarticulares, intrapleurales, intraperitoneales, intracerebrales, intraarteriales o intravenosas), tópicas (es decir, en superficies dérmicas y de la mucosa, incluyendo superficies de las vías aéreas) y transdérmicas, aunque la ruta más adecuada en cualquier caso dependerá de la naturaleza y severidad de la condición que está siendo tratada. La administración puede ser local o sistémica. Las formulaciones pueden ser presentadas en contenedores sellados de una dosis o de varias dosis, tales como ampollas y viales. Los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, aquí descritos, pueden ser preparados en una mezcla en una forma inyectable en dosis unitarias (incluyendo, pero sin limitarse a, soluciones, suspensiones o emulsiones) con un portador farmacéuticamente aceptable. El polipéptido de aminoácidos no naturales, modificado o no modificado, tal como se lo describe aquí, también puede ser administrado por medio de una infusión contigua (utilizando, incluyendo, pero sin limitarse a, bombas miniatura tales como bombas osmóticas), formulaciones de un bolus o depósitos de liberación lenta.

**[0219]** Formulaciones adecuadas para su administración incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bactericidas y solutos que vuelven a la formulación isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Las soluciones y suspensiones pueden ser preparadas de polvos, gránulos y tabletas estériles de los tipos descritos previamente.

**[0220]** La técnica de congelamiento - secado es una técnica empleada comúnmente para separar a las proteínas que sirve para remover agua de la preparación proteínica de interés. El congelamiento - secado, o liofilización, es un proceso por el cual el material que va a ser secado es congelado primero y después el hielo o el solvente congelado es removido por medio de sublimación en un entorno al vacío. Un excipiente puede ser incluido en las formulaciones pre - liofilizadas para mejorar la estabilidad durante el proceso de congelamiento - secado y / o para mejorar la estabilidad del producto liofilizado cuando éste sea almacenado. Pikal, M. Biopharm. 3(9)26-30 (1990) y Arakawa et al. Pharm. Res. 8(3):285-291 (1991).

**[0221]** El secamiento y aplicación de aerosol de farmacéuticos también es conocido para aquellas personas con un conocimiento normal en la industria. Por ejemplo, refiérase a, Broadhead, J. et al., "The Spray Drying of Pharmaceuticals" ("El Secado de Aerosoles de Farmacéuticos"), in Drug Dev. Ind. Pharm, 18 (11 & 12), 1169-1206 (1992). Adicionalmente a farmacéuticos de moléculas pequeñas, una variedad de materiales biológicos han sido secados para aerosoles y estos incluyen: enzimas, sueros, plasma, microorganismos y levaduras. Secamiento de aerosoles es una técnica útil porque puede convertir una preparación farmacéutica líquida en un polvo fino, aglomerado sin desperdicios en un proceso de un paso. La técnica básica comprende el seguimiento de cuatro pasos: a) la atomización de la solución suministrada a un aerosol; b) contacto del aerosol con el aire; c) secado del aerosol, y d) separación del producto secado del aire de secamiento. Las Patentes de Estados Unidos números 6,235,710 y 6,001,800, describen la preparación de eritropoyetina recombinante para el secado de aerosoles.

**[0222]** Las composiciones farmacéuticas aquí descritas pueden incluir a un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que está siendo administrada, así como por el método particular usado para administrar la composición. Asimismo, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas (incluyendo portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales) para los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, aquí descritos (refiérase, por ejemplo, a Remington's Pharmaceutical Sciences (Ciencias Farmacéuticas), 17ma ed. 1985)). Portadores adecuados incluyen a amortiguadores que contienen succinato, fosfato, borato, HEPES, citrato, imidazol, acetato, bicarbonato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo, pero sin limitarse a, ácido ascórbico; polipéptidos de masa molecular baja incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos menores de alrededor de 10 residuos; proteínas, incluyendo, pero sin limitarse a, albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos incluyendo, pero sin limitarse a, polivinilpirrolidona; aminoácidos incluyendo, pero sin limitarse a, glicina, glutamina, asparagina, arginina, histidina o derivados de histidina, metionina, glutamato o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo, pero sin limitarse a, trehalosa, sacarosa, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes incluyendo, pero sin limitarse a, EDTA; iones metálicos divalentes incluyendo, pero sin limitarse a, cinc, cobalto, o cobre; alcoholes de azúcar incluyendo, pero sin limitarse a, manitol o sorbitol; iones que compensan formaciones de sal incluyendo, pero sin limitarse a, sodio; y / o

5 surfactantes no iónicos incluyendo, pero sin limitarse a, Tween™ (incluyendo, pero se limitarse a, Tween 80 (polisorbato 80) y Tween 20 (polisorbatos 20), Pluronic™ y otros ácidos plurónicos, incluyendo, pero sin limitarse a, ácido plurónico (poloxámero 188), o PEG. Surfactantes adecuados Nugent por ejemplo, pero sin limitarse a, poliéteres que se basan en poli (óxido de etileno) -poli (óxido de propileno) -poli (óxido de etileno), es decir, (PEO-PPO-PEO), o poli (óxido de propileno) -poli (óxido de etileno) -poli (óxido de propileno), es decir (PPO-PEO-PPO), o sus combinaciones. PEO-PPO-PEO y PPOPEO-PPO están comercialmente disponibles bajo las marcas Pluronic™, R-Pluronic™, Tetronics™ y R-Tetronics™ (BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.) y son descritas en mayor detalle en la patente de Estados Unidos número 4,820,352. Otros polímeros que bloquean etilenos / polipropilenos pueden ser surfactantes adecuados. Un surfactante o una combinación de surfactantes puede ser utilizada para estabilizar un polipéptido de aminoácidos no naturales (modificados) en contra de uno o más estrés incluyendo, pero sin limitarse a, ésteres que resultan de agitación. Algunos de los anteriores pueden ser denominados “agentes aglutinantes”. Algunos pueden ser denominados “modificadores de tonicidad”.

15 **[0223]** Los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, aquí descritos, incluyendo aquellos enlazados a polímeros solubles en agua tales como PEG, también pueden ser administrados por, o como una parte de sistemas de liberación sostenida. Composiciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitarse a, matrices de polímeros semi - permeables en la forma de artículos moldeados, incluyendo, pero sin limitarse a, láminas o micro cápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen desde materiales biocompatibles tales como poli (metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 267-277 (1981); Langer, Chem. Tech., 20 12: 98-105 (1982), acetato de vinilo de etileno (Langer et al., mencionado anteriormente) o ácido poli-D - (-) - 3-hidroxi-butírico (EP 133,988), polilactidas (ácido poliláctico) (patente de Estados Unidos número 3,773,919; EP 58,481), poliglicólido (polímero del ácido glicólico), polilactida co - glicolida (copolímeros de ácido láctico y de ácido glicólico) polianhídridos, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers (Biopolímeros), 25 22, 547-556 (1983), poli (orto) ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, propileno polivinílico, polivinilpirrolidona y silicona. Composiciones de liberación sostenida también incluyen un compuesto liposomalmente atrapado. Liposomas que contienen el compuesto son preparadas por medio de métodos conocidos: DE 3,218,121; Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; la patente de Estados Unidos número 4,619,794; EP 143,949; la patente de Estados Unidos número 5,021,234; la aplicación de patente japonesa 83-118008; las patentes de Estados Unidos números 4,485,045 y 4,544,545; y EP 102,324.

35 **[0224]** Los polipéptidos atrapados liposomalmente pueden ser preparados por métodos descritos en, por ejemplo, DE 3,218,121; Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; la patente de Estados Unidos número 4,619,794; EP 143,949; la patente de Estados Unidos número 5,021,234; la aplicación de patente japonesa 83-118008; las patentes de Estados Unidos números 4,485,045 y 4,544,545; y EP 102,324. Las composiciones y el tamaño de los liposomas son bien conocidos o capaces de determinarse fácilmente en forma empírica por una persona con un conocimiento normal en la industria. Algunos ejemplos de liposomas son descritos en, por ejemplo, Park JW, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 92:1327-1331 (1995); Lasic D y Papahadjopoulos D (eds): MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES (APLICACIONES MÉDICAS DE LIPOSOMAS) (1998); Drummond DC, et al., Liposomal drug delivery systems for cancer therapy, in Teicher B (Sistemas de entrega de medicamentos liposomales para terapias del cáncer, en Teicher B) (ed): CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT (DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE MEDICINAS CONTRA EL CÁNCER) (2002); Park JW, et al., Clin. Cancer Res. 8:1172-1181 (2002); Nielsen UB, et al., Biochim. Biophys. Acta 1591(1-3):109-118 (2002); Mamot C, et al., Cancer Res. 63: 3154-3161 (2003).

50 **[0225]** La dosis administrada a un paciente en el contexto de las composiciones, formulaciones y métodos aquí descritos, deberán ser suficientes para causar una respuesta beneficiosa en el sujeto al pasar del tiempo. Generalmente, el monto tope al farmacéuticamente efectivo de los polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, tal como se describe en este documento, administrado parenteralmente por dosis está en el rango de alrededor de 0.01 microgramos / kilogramos/día a 100 µg / kilogramos, o alrededor de 0.05 miligramos / kilogramos a 1 mg / kilogramos, de la masa corporal del paciente, aunque esto está sujeto a la discreción terapéutica. La frecuencia de las dosis también es sujeto a la discreción terapéutica, y podrían ser más o menos frecuentes que los productos comercialmente disponibles aprobados para su uso en humanos. Generalmente, un polímero: conjugación de polipéptidos, incluyendo, en forma de ejemplo nada más, un polipéptido PEGilado, tal como se lo describe en este documento, puede ser administrado por medio de cualquiera de las rutas de administración ya mencionadas.

## 60 XI. Aislamiento y purificación

### A. Cromatografía

5 [0226] En cualquiera de las instancias aquí mencionadas, el aislamiento de péptidos, los polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados) que enlaza a compañeros o a receptores con polipéptidos pueden realizarse por medio de cromatografía. La cromatografía se basa en la absorción o elución diferencial de polipéptidos. La muestra es disuelta en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil es forzada entonces a través de una fase estacionaria inmisible, que está fija en una columna o en una superficie sólida. Ejemplos de fases estacionarias incluyen líquidos adsorbidos en una especie sólida orgánica enlazada a una superficie sólida, a un sólido, a una resina y un líquido de intercambio de iones en intersticios de un sólido polimérico. La habilidad de un polipéptido para ser purificado por medio de diferentes métodos cromatográficos de aislamiento / purificación de otro tipo pueden ser modulados por medio de la adición o sustracción de uno o más aminoácidos no naturales con un aminoácido no natural en combinación opcional con uno o más sustituciones de aminoácidos naturales. Por lo tanto, las propiedades del polipéptido pueden modificarse al alterar la composición de aminoácidos permitiendo un incremento o una reducción de su interacción con matrices conocidas. Cambios a la composición de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a características en el contenido de los aminoácidos hidrofóbicos, contenidos de los aminoácidos hidrofílicos, cambios se encarga, pl o de otro tipo del polipéptido. 10 Aquellas modificaciones pueden ser útiles para aislar las proteínas de las membranas que son difíciles de aislar puesto que son de naturaleza hidrofóbica y mantienen su conformación natural. 15

### Cromatografía de gases

20 [0227] En una instancia el aislamiento de polipéptidos puede ocurrir por medio de cromatografía de gases (GC - gas chromatography). La muestra es vaporizada e inyectada a la cabeza de una columna cromatográfica. Ejemplos de fases móviles de gases incluyen, pero no se limitan a, helio, argón, nitrógeno, dióxido de carbono e hidrógeno. En una instancia, la muestra es aislada por medio de cromatografía sólida de gases, donde la fase estacionaria es un sólido. Ejemplos de fases estacionarias sólidas son tamices y polímeros porosos. En otra instancia, el polipéptido es aislado por medio de cromatografía líquida de gases, donde la fase estacionaria es un líquido inmovilizado en la superficie de un sólido inerte. Ejemplos de fases estacionarias líquidas incluyen Polidimetilsiloxano, poli (fenilmetildimetil) siloxano (10% fenilo), poli (fenilmetil) siloxano (50% fenilo), poli (trifluoropropildimetil) siloxano, polietilenglicol y poli (dicianoallildimetil) siloxano. 25

30 [0228] Las columnas GC convencionales son empacadas y abiertas tubularmente o capilarmente. Columnas cromatográficas varían en longitud desde menos de 2 m hasta 50 m o más. Ejemplos de materiales para su construcción incluyen acero inoxidable, metal, vidrio, sílice y teflón fusionado. Típicamente las columnas GC tienen un diámetro interno de alrededor de 2 a 4 mm. Micro GCs tienen un diámetro interno de alrededor de 1 mm. Capilares GC utilizan un capilar con un diámetro interno de alrededor de 100 a 750  $\mu\text{m}$ . Nano GCs también están disponibles con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$  - 1 mm. 35

### Cromatografía líquida

40 [0229] En una instancia el aislamiento de polipéptidos puede ocurrir por medio de cromatografía líquida (LC - liquid chromatography). LC involucra el uso de un portador de fluidos sobre una fase estacionaria. La mayoría de columnas LC varían en su largo desde 10 a 30 cm. Las columnas LC son construidas normalmente de tuberías de acero inoxidable de animasa lisa, aunque tuberías de vidrio pesado se encuentran ocasionalmente. Columnas LC convencionales tienen un diámetro interno de alrededor de 4.6 milímetros y una tasa de caudal de alrededor de 1 ml / min. Micro LC tienen un diámetro interno de alrededor de 1.0 milímetros y un flujo de caudal de alrededor de 40  $\mu\text{l}$  / min. LC capilares utilizan un capilar con un diámetro interno de alrededor de 300  $\mu\text{m}$  y una tasa de caudal de alrededor de 5  $\mu\text{l}$  - 1mm. Nano LCs están disponibles con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$  - 1 mm y tasas de caudal de 200 nl / min. Nano LCs pueden variar en longitud, por ejemplo, 5, 15 o 25 cm. La fase estacionaria de nano LCs también puede ser de un material monolítico, tal como el monolitio polimérico o un mono litio de gel sol. Dos tipos básicos de material del que han sido utilizados en la cromatografía líquida, partículas no porosas y porosas. Las esferas o partículas son caracterizadas generalmente por el tamaño de las partículas y de los poros. Los tamaños de las partículas varían generalmente entre 3 y 50 micrones. Partículas más largas generarán menos presión en el sistema y articulares más pequeñas generarán más presión. Las partículas más pequeñas dan generalmente eficiencias de separación más altas. El tamaño de los poros de las partículas se mide en angstroms y varían generalmente entre 100 y 1000 A. esto puede ser cubierto con una capa porosa de sílice, alúmina, resina de intercambio de iones, una capa de la superficie orgánica, polímeros, ligandos, carbohidratos o un cofactor específico. 50 55

60 [0230] En otra instancia, los polipéptidos pueden ser aislados utilizando tecnología HPLC. En otra instancia, el polipéptido puede ser aislado utilizando cromatografía de columna. En la cromatografía de columna, el medio sólido es empacado a una columna de cromatografía, y la mezcla inicial que contiene al polipéptido es ejecutada por medio de la columna para permitir los enlaces. Un amortiguador de lavado es colocado en la columna, y el amortiguador de elución es aplicado subsecuentemente a la columna para la recolección de la muestra. Estos pasos pueden ser realizados en presión ambiental. En otra instancia, el enlace de los polipéptidos a una fase sólida puede lograrse usando un tratamiento por lotes, al añadir la mezcla inicial a la fase sólida en el contenedor, mezclando los puntos, separando la fase sólida (por ejemplo, por medio de centrifugación), removiendo la fase líquida, lavando, re centrifugando, añadiendo amortiguadores de elución, re - centrifugando y removiendo el eluido. En otra instancia, un 65

método híbrido es utilizado en el cual el enlace es hecho por el método de lotes, la fase sólida con el enlace de la molécula objetiva es hecho por medio del método de lotes, la fase sólida con el enlace de la molécula objetiva es empacada a una columna, y se realiza el lavado y la elución en la columna. En otra instancia, el aislamiento de los péptidos ocurre en un dispositivo micro fluido. En otra instancia, el aislamiento de los péptidos ocurre en un dispositivo nano fluido.

### **Cromatografía de la partición**

[0231] En una instancia, el aislamiento de los polipéptidos ocurre por medio de cromatografía de partición. En una instancia, el aislamiento de los polipéptidos ocurre por medio de cromatografía de la partición líquido - líquido. Con la cromatografía de partición líquida - líquida, una fase estacionaria líquida es retenida en la superficie del empaque por medio de adsorción física. En otra instancia, el aislamiento de los polipéptidos puede ocurrir por medio de cromatografía de partición de una fase enlazada. Con la cromatografía de partición de una fase enlazada, la fase estacionaria es enlazada químicamente a la superficie del soporte.

[0232] En otra instancia, se utiliza cromatografía de fase normal para aislar a los polipéptidos. En una cromatografía de fase normal, una fase estacionaria polar es utilizada junto con un solvente no polar. Ejemplos de la fase estacionaria para la cromatografía de fase normal incluyen, pero no se limitan a, agua, alcoholes y trietilenglicol. Ejemplos de solventes no polares para la cromatografía de la fase normal incluyen, pero no se limitan a, etilo, éter, cloroformo, tetrahidrofurano, fluoroalcanos, ciclohexanos, 1-clorobutanos, tetracloruro de carbonos, toluenos, éteres dietílicos, hexanos y i-propiléteres. En una instancia, la cromatografía de partición utiliza empaques de fases en reversa; esto es referido como cromatografía de fases reversadas. En la cromatografía de fases reversadas, una fase estacionaria no polar es utilizada en conjunto con una fase móvil polar. Ejemplos de fases estacionarias para cromatografías de fases reversadas incluyen, pero no se limitan a, hidrocarbonos, éter, esterres, cetonas, aldehídos, amidas, y aminos. Ejemplos de fases estacionarias móviles para la cromatografía de fases reversadas incluyen agua, metanol, etanol, acetato etílico, dioxano, nitrometano, etilenglicol, tetrahidrofurano y acetonitrilo.

[0233] En una instancia, el tipo de cromatografía reversada que puede ser utilizado para aislar a los polipéptidos es una cromatografía de parejas iónicas. La fase móvil en la cromatografía de parejas iónicas consiste de un amortiguador acuoso que contiene un solvente orgánico tal como el metanol o el acetonitrilo y un compuesto iónico que contiene un ion de contra acción de carga opuesta a los polipéptidos. El ion de contra acción que se enlaza al polipéptido para formar una pareja iónica, que es una especie neutral que está retenida por un empaque de fase reversada. La elución de las partículas iónicas se logra con una solución acuosa de metanol u otro solvente orgánico soluble en agua tal como los que se acaban de describir. Ejemplos de iones de contra acción son  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_3^-$ ,  $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+$ ,  $(\text{C}_{16}\text{H}_{33})(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ ,  $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+$ , Bis- (2-etilhexil) fosfato y  $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+$ .

[0234] En una instancia, los polipéptidos pueden ser aislados utilizando cromatografía de partición con una fase estacionaria quiral. Ejemplos de los tipos de fases estacionarias quirales incluyen, pero no se limitan a, fases estacionarias que se basan en proteínas, quirales de masa molecular pequeña, polímeros de celulosa y amilosa, glicopéptidos macrocíclicos y materiales que se basan en la ciclodextrina.

### **Cromatografía de adsorción**

[0235] En una instancia, los polipéptidos del aislamiento pueden ocurrir por medio de cromatografía de adsorción. Adsorción es un proceso por el cual el material (contenido en la fase móvil) interactúa debido a fuerzas físicas (dispersivas, polares o iónicas) con una fase estacionaria, causando, por lo tanto, en una capa (o capas) de un material se adhiera a aquella fase estacionaria. La fase estacionaria en la mayoría de casos será un sólido (por ejemplo, gel de sílice, alúmina, carbón, etcétera) o a veces un líquido (por ejemplo, surfactantes en superficies de agua) la capa o las capas superficiales pueden ser simples, dobles o múltiples. Ejemplos de solventes que pueden ser usados en cromatografía de adsorción incluyen agua, metanol, etanol, acetato etílico, dioxano, nitrometano, etilenglicol, tetrahidrofurano, acetonitrilo, etilo, éter, cloroformo, tetrahidrofurano, fluoroalcanos, ciclohexano, 1-clorobutano, tetracloruro de carbono, tolueno, éter dietílico, hexano y i-propiléter.

### **Cromatografía de intercambio de iones**

[0236] En una instancia, el aislamiento de los polipéptidos puede ocurrir por medio de una cromatografía de intercambio iónico. En una cromatografía de intercambio iónico el aislamiento de los polipéptidos se basa en una resina de intercambio iónico. La resina de intercambio iónico puede ser una resina de intercambio de aniones o una resina de intercambio de cationes. La resina de intercambio iónico puede ser hecha por medio de intercambiadores iónicos naturales, tales como arcillas y zeolitas o de intercambiadores iónicos sintéticos. Ejemplos de lugares activos comunes para las resinas de intercambio de cationes son el grupo de ácidos sulfúrico  $-\text{SO}_3\text{-H}^+$ , el grupo de ácidos carboxílicos  $-\text{COO-H}^+$  y el ácido fosfórico  $-\text{PO}_3\text{H}_2$ . Ejemplos de lugares activos comunes para resinas de intercambio de aniones son los grupos de aminos cuaternario es  $\text{N}(\text{CH}_3)^+\text{OH-}$  o grupos de aminos primarios  $-\text{NH}_3^+\text{OH-}$ . La fase móvil en la cromatografía de intercambio iónico es generalmente una solución acuosa que puede

contener montos moderados de metanol u otros solventes orgánicos mezclables con agua; estas fases móviles también contienen especies iónicas en la forma de un amortiguador.

5 **[0237]** En una instancia la columna de intercambio iónico es eluída con un gradiente de concentraciones salinas. En un ejemplo, bombas aumentan montos crecientes de sal al amortiguador en la medida en que éste va a la columna de tal forma que exista un incremento continuo gradual en la concentración iónica que pasa por la columna. Las proteínas “eluyen” o se desprenden de la fase estacionaria de la columna cuando la fuerza iónica del amortiguador neutraliza su carga. Las moléculas menos cargadas se desprenden primero, y la mayoría de las que están altamente cargadas se desprenden al último. En otro ejemplo, la columna es desactivada completamente con amortiguadores para incrementar su fuerza iónica hasta que la proteína deseada se eluye; esta misma secuencia exacta es repetida cada vez con los mismos montos de amortiguador para dar producciones reproducibles y para facilitar la purificación de la proteína.

15 **[0238]** En una instancia, la muestra será expuesta a la remoción de altas concentraciones salinas después del aislamiento del polipéptido de interés por medio de cromatografía de intercambio iónico. En una instancia, la remoción de la concentración altamente salina se realizará por medio de diálisis. La diálisis aprovecha el uso de las membranas semi - permeables. La característica principal de la membrana de diálisis es que es porosa. Sin embargo, el tamaño de los poros es tal que mientras los iones pequeños de sales pueden pasar libremente a través de la membrana, las moléculas proteínicas más grandes no podrán hacerlo (es decir, son retenidas). Por lo tanto, las membranas de diálisis se caracterizan por la masa molecular de la proteína globular típica más pequeña que ésta retendrá. La remoción de concentraciones altamente salinas puede lograrse en un solo paso o varios pasos de diálisis. En otra sección, la remoción de altas concentraciones salinas es realizada por medio de electrodiálisis. Electrodiálisis es un proceso de electro membranas en el cual los iones son transportados a través de membranas permeables iónicas de una solución a otra bajo la influencia de un gradiente potencial. Puesto que las membranas utilizadas en electrodiálisis tienen la habilidad de transportar selectivamente iones que tienen cargas positivas o negativas y rechazar a iones de la carga opuesta. La electrodiálisis es útil para la concentración, remoción o separación de electrolitos.

25 **[0239]** En otra instancia, la remoción de la alta concentración de sal se logra al usar columnas de desalación en una filtración de gel de flujo de gravedad. La filtración de gel de flujo de gravedad involucra la separación cromatográfica de moléculas de diferentes dimensiones basándose en sus habilidades relativas para penetrar a una fase estacionaria adecuada. Las columnas de desalación son empacadas con esferas celulósicas porosas pequeñas. Estas columnas tienen una esfera húmeda con diámetros específicos. El diámetro de las esferas utilizadas dependerá de la masa molecular del péptido de interés. Diferentes niveles de separación pueden ser logrados basándose en el tamaño de los poros del medio empacado dentro de la columna. El medio puede ser escogido para excluir totalmente proteínas o moléculas grandes, y al mismo tiempo incluir solutos pequeños. Las moléculas grandes son excluidas de los poros internos del gel y emergen primero de la columna. Las moléculas más pequeñas pueden penetrar los poros, y después avanzan a través de la columna a una tasa más lenta. Estas moléculas más pequeñas son subsecuentemente vaciadas a través de la columna con un volumen adicional de amortiguador.

#### 40 **Cromatografía de exclusión por tamaño**

45 **[0240]** En una instancia, el aislamiento de los polipéptidos puede ocurrir por medio de cromatografía de exclusión por tamaño, también conocida como cromatografía de permeación de gel, o filtración de gel. Las moléculas que son más grandes que el tamaño de poro promedio del empaque son excluidas y por lo tanto no sufren ninguna retención. Ejemplos de empaques por medio de cromatografía por exclusión de tamaño incluyen sílice, esferas de celulosa y partículas poliméricas. Convencionalmente, vidrios porosos y partículas sílices tienen un tamaño promedio de poros que varían desde 40 Å a 2500 Å. En algunas instancias, el límite de exclusión de masa celular de un empaque de polímero con un tamaño de poro promedio de 102 Å es 700. En otra instancia, el límite de exclusión de masa molecular de un empaque de un polímero con un tamaño de poro promedio de 103 Å es  $(0.1 \text{ a } 20) \times 10^4$ . En otra instancia, el límite de exclusión de masa molecular de un empaque de polímero con un tamaño de poro promedio de 104 Å es  $(\text{uno a } 20) \times 10^4$ . En otra instancia, el límite de exclusión de masa molecular de un empaque de polímero con un tamaño de poro promedio de  $10^5$  Å es  $(\text{uno a } 20) \times 10^5$ . En otra instancia, el límite de exclusión de masa molecular de un empaque de polímero con un tamaño de poro promedio de  $10^6$  Å es  $(5 \text{ a } 10) \times 10^6$ . En alguna instancia, el límite de exclusión de masa molecular de un empaque sílice con un tamaño de poro promedio de 125 Å es  $(0.2 \text{ a } 5) \times 10^4$ . En otra instancia, el límite de exclusión de masa molecular de un empaque sílice con un tamaño de poro promedio de 300 Å es  $(0.03 \text{ a } 1) \times 10^5$ . En otra sección, el límite de exclusión de masa molecular de un empaque sílice con un tamaño de poro promedio de 500 Å es  $(0.05 \text{ a } 5) \times 10^5$ . En otra instancia, el límite de exclusión de masa molecular de un empaque sílice con un tamaño de poro promedio de 1000 Å es  $(\text{cinco a } 20) \times 10^5$ .

#### 60 **Cromatografía de capa delgada**

65 **[0241]** En una instancia, el aislamiento de los polipéptidos puede ocurrir por medio de la cromatografía con una capa delgada. Los métodos de cromatografía con una capa delgada incluyen cromatografía con papel, cromatografía con

una capa delgada y electrocromatografía. Cada una utiliza una capa plana delgada de material que es autosostenible o que está cubierto en una superficie de vidrio, plástico o metal. La fase móvil se mueve a lo largo de la fase estacionaria por medio de una acción capilar, a veces asistida por la gravedad o por el potencial eléctrico. En una instancia, la separación plana es realizada en placas planas de vidrio o plástico que son cubiertas con una capa delgada y adherente de partículas divididas finamente; esta capa constituye la fase estacionaria. La fase estacionaria y la fase móvil son similares a aquellas cubiertas en las cromatografías de adsorción, de partición de fases normal y reversadas, de intercambio iónico y de exclusión por tamaño. En una instancia, los polipéptidos son ubicados en la placa al rociar una solución que reaccionara con compuestos orgánicos para producir productos oscuros. Ejemplos de este tipo de soluciones incluyen soluciones de ninhidrina, de yodo y ácido sulfúrico. En otra instancia, los polipéptidos son ubicados al incorporar un material fluorescente de a la fase estacionaria. La placa es examinada bajo luz ultravioleta. Los componentes de la muestra neutralizan al material fluorescente para que todas las fluorescencias sean ubicadas excepto donde se encuentran los componentes de la muestra no fluorescentes.

### Cromatografía de afinidad

[0242] En una instancia, el aislamiento de polipéptidos puede ocurrir por medio de cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad se basa en la habilidad para diseñar una fase estacionaria que enlaza reversiblemente a un subconjunto conocido de moléculas. La purificación de la afinidad involucra generalmente los siguientes pasos: 1) incubar una muestra cruda con el material de soporte del ligando inmovilizado para permitir a la molécula objetiva en la muestra enlazarse al ligando inmovilizado, 2) lavar los componentes de la muestra no enlazados del soporte sólido y 3) eluir (separar y recuperar) la molécula objetivo del ligando inmovilizado al alterar las condiciones de amortiguamiento para que la interacción de enlace ya no ocurra. Ejemplos de amortiguadores de elución utilizados en la cromatografía de afinidad incluyen, pero no se limitan a, 100 mM de glicina \* HCl, 100mM de ácido cítrico, 50 - 100 mM de trietilamina o trietanolamina, 150 mM de hidróxido de amonio, 3.5 - 4.0 M de cloruro de magnesio en 10 mM Tris, 5 M de cloruro de litio en 10 mM de tampón fosfato, 2.5 M de yoduro de sodio, 0.2 - 3.0 de tiocianato de sodio, 2 - 6 M de guanidina\*HCl, 2 - 8 M de urea, 1% de desoxicolato, 1% de SDS, 10% de dioxano, 50% de etilenglicol, 0.1 M de Glicina - NaOH, 0.1 de Glicina - NaOH con un 50% de etilenglicol, 3.0 M de cloruro de potasio, 0.1 M de Tris-acetato con 2.0 M de NaCl, 5.0 M de yoduro de potasio, 1% de SDS, 1 % de deoxicolato de sodio, 2.0 M de Urea, 6.0 M de urea, 2.0 M de Guanadina - HCl, 1.0 M de tiocianato de amonio y más de 0.1 M anti ligandos o análogos.

[0243] En una instancia, la fase estacionaria involucra un ligando que incluye, pero no se limita a, un carbohidrato específico o un cofactor. En otra instancia, los polipéptidos pueden ser eluidos con una concentración alta de carbohidrato o un cofactor específico. Mímicos para lugares de enlaces pueden ser utilizados a veces como fases estacionarias de afinidad. Azúcares específicos inhibidores o cofactores utilizados en la fase estacionaria variarán de acuerdo a las propiedades del polipéptido e incluirán a cualquier ligando, carbohidrato o copa por conocido en la industria.

[0244] En otra instancia, la fase estacionaria inmovilizada incluye a un colorante. Ejemplos de colorantes usados comúnmente para la cromatografía de colorante - ligando incluyen a Reactive Blue 2 (Cibacron® Blue 3GA), Reactive Red 120 (Procion® Red HE3B), Reactive Blue 4 (Reactive Blue MRB )TC, Reactive Green 5 (Reactive Green H4G)TC, Reactive Green 19 (Reactive Green HE4BD)TC, Green 19A (Reactive Green HE4BD)TC, Reactive Yellow 86 (Reactive Yellow M8G)TC y Reactive Brown 10 (Reactive Brown M4R )TC.

[0245] En otra instancia, la fase estacionaria incluye una resina de quelado de metales. En la cromatografía de quelado de metales iones metálicos tales como  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  son inmovilizados a una fase estacionaria de cromatografía cuando el enlace quelado participa en la alteración irreversible con grupos donantes de electrones ubicados en la superficie de los polímeros con un valor pH en el cual el grupo de electrones donante está presente en por lo menos, parcialmente, en una forma no protonizada, el polipéptido que está enlazado a la fase estacionaria puede ser eluido subsecuentemente por medio de un amortiguador con un valor pH menor al del grupo de electrones es protonizados. Ejemplos de resinas queladas incluyen 8-hidroxiquinolina, ácido salicílico, ácido dietilentriaminico, ácido dietilentriaminetetraacético, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid), ácido iminodiacético y ácido nitrilotriacético.

[0246] En otra instancia, el aislamiento de polipéptidos puede ocurrir por medio de cromatografía de inmunoafinidad. El principio de cromatografía de inmunoafinidad o inmunoadsorción se basa en la interacción altamente específica de un antígeno con su anticuerpo. La cromatografía de afinidad utiliza un anticuerpo o el fragmento de una péptido como un ligando inmovilizado en la fase estacionaria en una forma que retenga su capacidad de enlace. La elución del polipéptido retenido se logra por medio de alteraciones a las condiciones de la fase móvil que debilitan la interacción entre el anticuerpo y el antígeno. Las condiciones de elución tienen el propósito de romper los enlaces iónicos, hidrofóbico y de hidrógeno que mantienen al antígeno y al anticuerpo juntos. Condiciones de elución exitosas dependerán de la interacción específica entre el antígeno - anticuerpo que están ocurriendo.

[0247] Los anticuerpos pueden ser generados para reconocer a los aminoácidos naturales presentes en el polipéptido. Aquellos anticuerpos pueden ser utilizados en la cromatografía de afinidad para purificar los polipéptidos



de aminoácidos no naturales de una mezcla compleja o permitir la conjugación del polipéptido con otras moléculas en un soporte tal como una resina, en inmunoensayos para detectar la presencia de polipéptidos de aminoácidos no naturales, en otros ensayos que utilizan anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser generados para reconocer uno o más aminoácidos naturales presentes en la terminal N o C de un polipéptido u otras porciones del polipéptido

5 **[0248]** Los polipéptidos de aminoácidos no naturales pueden ser anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o polipéptidos con enlaces a antígenos o sus fragmentos, y utilizados para aislar a antígenos por medio de cromatografía de afinidad.

10 **[0249]** En una instancia, el aislamiento de los polipéptidos puede ocurrir por medio de cromatografía de interacción hidrofóbica. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos no naturales hidrofílicos e hidrofóbicos y aminoácidos naturales hidrofílicos e hidrofóbicos. Los polipéptidos son separados de acuerdo a su hidrofobicidad relativa por su habilidad para enlazarse reversiblemente a compuestos hidrofóbicos. Los polipéptidos son eluidos desde la columna con concentraciones decrecientes de sal en el amortiguador. Ejemplos de compuestos hidrofóbicos incluyen, pero no se limitan a, cadenas de ácidos grasos hidrofóbicos, compuestos, grupos funcionales n -butilos, compuestos con grupos funcionales n-octilos y compuestos con grupos funcionales fenilos.

### **Cromatografía de fluidos súper críticos**

20 **[0250]** En una instancia, el aislamiento de polipéptidos puede ocurrir por medio de cromatografía súper crítica (SFC). En SFC, la muestra es pasada por una columna separadora por un fluido supercrítico cuando la mezcla es dividida en bandas únicas que se basan en el monto de interacción entre los analitos individuales y la fase estacionaria en la columna. Las columnas SFC convencionales son empacadas y tubulares o capilarmente abiertas. Columnas tubulares abiertas varían en el largo desde 10 m a 20 m o más. Las columnas tubulares abiertas comúnmente tienen un diámetro interno de alrededor de 0.05 a 4 mm. Las columnas de empaque varían en diámetro desde 0.5 milímetros o menos hasta 4.6 milímetros, con diámetros de partículas que varían desde 3 a 10 micrómetros. Las columnas empacadas contienen partículas desactivadas pequeñas a las cuales las fases estacionarias se adhieren. Las columnas son convencionalmente de acero inoxidable. Las columnas capilares son columnas tubulares abiertas de un diámetro interno angosto hecho de sílice fundido, con la fase estacionaria enlazada a la pared de la columna. Las coberturas son similares a aquellas usadas en la cromatografía de partición. Ejemplos de fluido supercrítico subutilizados en SFC incluyen, pero no se limitan a, dióxido de carbono, etano, pentano, óxido nitroso, diclorodifluorometano, éter dietílico, amoníaco y tetrahydrofurano. En algunas aplicaciones, los modificadores orgánicos polares tales como el metanol son introducidos en concentraciones pequeñas (1 – 5 %).

### **B. Precipitación**

35 **[0251]** En una instancia, el aislamiento de péptidos, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados), compañeros de enlace o receptores de los polipéptidos pueden ocurrir por medio de precipitación. La solubilidad de polipéptidos es una función de la fuerza iónica y del pH de la solución. Los polipéptidos tienen puntos isoeléctricos en los cuales las cargas de sus grupos laterales de aminoácidos se balancean entre sí. Si la fuerza iónica de una solución es muy alta o muy baja, las proteínas tenderán a precipitar a su punto isoeléctrico. En una sección, la fuerza iónica de la solución será incrementada al aumentar sal. Ejemplos de sales utilizadas en los métodos de precipitación incluyen, pero no se limitan a, sulfato de amonio y sulfato de sodio. Cualquier sal conocida en la industria por su precipitación proteínica puede ser utilizada en cualquiera de las secciones de los inventos. En otra instancia, los polipéptidos serán forzados fuera de la solución con polímeros. Un ejemplo de un polímero usado comúnmente para precipitar polipéptidos es el polietilenglicol. Cualquier polímero conocido en la industria para precipitación proteínica puede ser utilizado en cualquiera de las secciones de los inventos. En una instancia, los polipéptidos precipitados son removidos por medio de centrifugación o filtración.

50 **[0252]** En una instancia, después de la precipitación del polipéptido de interés por medio de la adición de sales a la solución la muestra estará sujeta a la remoción de altas concentraciones salinas. Los métodos de desalación son discutidos en la sección de cromatografía de intercambios iónicos.

### **Inmunoprecipitación**

55 **[0253]** En una instancia, el aislamiento de polipéptidos puede ocurrir por medio de inmunoprecipitación (IP). IP se refiere a la purificación de afinidad de baja escala de antígenos usando un anticuerpo específico. La inmunoprecipitación clásica incluye los siguientes pasos: 1) incubar anticuerpos específicos con una muestra que contenga al antígeno, 2) capturar complejos de anticuerpos - antígenos con gel de agarosa con proteínas A o G inmovilizadas (las proteínas a o G se vinculan con el anticuerpo, el cual está vinculado a su antígeno), 3) lavar el gel con un amortiguador para remover los componentes no vinculados de la muestra, 4) eluir el antígeno (y el anticuerpo).

65 **[0254]** En una instancia, un IP clásico es realizado en un tubo micro centrifugador con la muestra que contiene al polipéptido utilizando un gel con proteína A o G inmovilizadas. El gel es puesto en un pellet por medio de

centrifugación después de cada paso (lavados y eluciones), y el material flotante es removido. Usualmente la muestra diluida siempre contendrá a antígenos y anticuerpos, y la electroforesis del gel reductor de la muestra diluida producirá bandas de antígenos y bandas de fragmentos de anticuerpos de cadenas pesadas y ligeras. Los métodos para obtener polipéptidos de la separación con gel mediante electroforesis son conocidos a aquellos con conocimiento normal en la industria.

[0255] En otra instancia, para evitar la contaminación de anticuerpos del antígeno diluido, se pueden realizar modificaciones al IP clásico para que el anticuerpo sea inmovilizado permanentemente y no se eluya con el antígeno. En un ejemplo, el anticuerpo está enlazado primero al gel de la proteína A o G y entonces el anticuerpo es reticulado covalentemente a la proteína A o G. En otro ejemplo, el anticuerpo es acoplado directamente a un soporte de afinidad activado. Los polipéptidos de aminoácidos no naturales pueden ser polipéptidos enlazados a dímeros y usados en inmunoprecipitaciones.

[0256] En una instancia, el material de soporte es un gel poroso tal como agarosa de esferas reticuladas o un co - polímero de acrilamida y azlactona – bls reticuladas. En una sección los polipéptidos del invento se pueden aislar por medio de una separación de afinidad magnética. Muestras que contienen a la molécula de interés son incubadas con esferas magnéticas que son derivadas con un anticuerpo u otro compañero de enlace. Un campo magnético es utilizado para jalar a las esferas magnéticas fuera de la solución y a la superficie. El amortiguador puede ser removido cuidadosamente, con las moléculas no enlazadas. Los protocolos que usan esferas magnéticas para el aislamiento de moléculas de interés son muy conocidos en la industria. Las esferas magnéticas pueden derivarse para que contengan grupos activos, incluyendo, pero sin limitarse a, ácidos carboxílicos o aminas primarias, o moléculas de afinidad específicas tales como estreptavidina o IgG anti - ratón, anti conejo o anti rata de cabra o proteínas A o G. En otra instancia, el soporte es un micro plato.

### C. Electroforesis

[0257] En cualquiera de las instancias aquí descritas, el aislamiento de polipéptidos puede ocurrir por medio de electroforesis. Electroforesis es la separación de moléculas iónicas tales como polipéptidos por medio de patrones de migración diferencial a través de un gel que se basa en el tamaño y carga iónica de las moléculas en un campo eléctrico. La electroforesis puede ser realizada en un gel, capilarmente o en un chip. Ejemplos de genes utilizados para electroforesis incluyen almidón, acrilamida, agarosa o cualquiera de sus combinaciones. Un gel suele ser modificado por medio de sus reticulantes, la adición de detergentes, la inmovilización de enzimas o anticuerpos (electroforesis de afinidad) o sustratos (zimografía) y gradientes de pH. Los métodos para obtener polipéptidos de geles de electroforesis son muy conocidos a aquellas personas que tienen conocimiento en la industria.

#### Electroforesis capilar

[0258] En una instancia, el aislamiento de péptidos, polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados), compañeros de enlace o receptores a los polipéptidos puede ocurrir por medio de electroforesis capilar (CE - capillary electrophoresis). CE puede ser utilizada para separar moléculas hidrofílicas complejas y solutos altamente cargados. Las ventajas de la CE incluyen su utilización de muestras pequeñas (tamaños que varían desde 0.001 a 10  $\mu$ l), rápida separación, fácil reproducibilidad, muy altas eficiencias, lo que significa que cientos de componentes pueden ser separados al mismo tiempo, es fácilmente automatizable, puede ser usado cuantitativamente y consume montos limitados de reactivos. La tecnología CE, en general, se relaciona a las técnicas de separación que utilizan capilaridades de sílice fundido de calibre estrecho para separar un grupo complejo de moléculas grandes y pequeñas. Altos voltajes son utilizados para separar las moléculas basándose en la diferencia en carga, tamaño e hidrofobicidad. Dependiendo en los tipos de capilares y amortiguadores utilizados, la CE puede ser segmentada aún más en técnicas de separación tales como la electroforesis de zonas capilares (CZE - capillary zone electrophoresis), el enfoque isoeléctrico capilar (CIEF - capillary isoelectric focusing) y la electrocromatografía capilar (CEC - capillary electrochromatography).

[0259] La electroforesis de zonas capilares (CZE - Capillary zone electrophoresis), también conocida como CE libre de soluciones (FSCE - free-solution CE), es la forma más simple de CE. El mecanismo de separación de la CZE se basa en diferencias en la tasa de carga - a - masa de los analitos. Es fundamental para la CZE la homogeneidad de la solución amortiguante y la fuerza constante del campo a lo largo del capilar. La separación se basa principalmente en la disociación controlada de pH de grupos ácidos en el soluto o la protonación de funciones básicas en el soluto.

[0260] El enfoque isoeléctrico capilar (CIEF - Capillary isoelectric focusing) permite a moléculas anfóteras, tales como polipéptidos, ser separadas por electroforesis en un gradiente de pH generado entre el cátodo y el ánodo. Un soluto migrará a un punto donde su carga neta es cero. En este punto isoeléctrico, (el pI del soluto), la migración para y la muestra es enfocada en una zona ajustada. En la CIEF, una vez que a un soluto se le ha enfocado a su pI, la zona desmovilizada irá pasando el detector ya sea por presión o por medios químicos.

[0261] La CEC es una técnica híbrida entre la cromatografía líquida tradicional (HPLC) y la CE. En esencia, los capilares CE son empacados con empaques HPLC y un voltaje es aplicado a lo largo del capilar empacado, que

genera un flujo electro - osmótico (EOF - electro-osmotic flow). El EOF transporta a los solutos a lo largo de los capilares hacia el detector. La partición amiento diferencial y la migración electroforética de los solutos ocurren durante su transporte hacia el detector, el cual conlleva a las separaciones CEC. Es, por lo tanto, posible el obtener selectividades de separación únicas usando la CEC en comparación con la HPLC y la CE. El perfil de flujo beneficioso del EOF reduce las deficiencias de ensanchamiento y separación de banda relacionadas con el flujo de algunos cientos de miles de placas por metro cuando se utiliza la CEC. La CEC también hace posible el utilizar empaques de diámetros pequeños y lograr eficiencias muy altas.

**[0262]** La cromatografía capilar electrocinética micelar (MECC - Micellar electrokinetic capillary chromatography) es un método electroforético capilar que permite la separación de solutos sin carga. En esta técnica, surfactantes, tales como dodecil de sulfato de sodio, son agregados al amortiguador operante en montos que exceden la concentración micelar crítica en la cual se forman las micelas. La superficie de las micelas aniónicas de este tipo tienen una carga negativa grande, lo que les da una movilidad electroforética grande hacia el electrodo positivo. La mayoría de amortiguadores, sin embargo, muestran una tasa electro osmótica tan alta hacia el electrodo negativo que las micelas aniónicas son pasadas hacia el electrodo negativo, pero a una tasa mucho más reducida. Esto forma una fase acuosa de movimiento rápido y una fase de micelas de movimiento más lento. Cuando la muestra es introducida al sistema, los componentes se distribuyen entre la fase cosa y la fase de hidrocarburos en el interior de las micelas.

**[0263]** Alternamente, la isotacoforesis (ITP - isotachopheresis) es un método para concentrar muestras por medio de separación electroforética usando un amortiguador no continuo. En la isotacoforesis, dos sistemas de amortiguamiento diferentes son utilizados para crear zonas en las cuales los analitos se separan. Durante un experimento de isotacoforesis es posible separar los cationes o los aniones pero no ambos. En la ITP, un volumen grande de una muestra es colocada entre un electrólito líder y un electrólito de terminación. Los analitos en la muestra se aglutinaron en bandas estrechas uno después del otro de acuerdo a su movilidad. Las técnicas pueden ser utilizadas en conjunto con la electroforesis capilar donde un sistema de electrolitos no continuos es utilizado en el lugar de la inyección de la muestra en el capilar.

**[0264]** Además, la isotacoforesis transitoria (tITP - transient isotachopheresis) es una variación de esta técnica usada comúnmente en conjunto con la electroforesis capilar (CE - capillary electrophoresis). Foret, F., et al. in "Trace Analysis of Proteins by Capillary Zone Electrophoresis with On- Column Transient Isotachopheretic Preconcentration" ("Análisis de Rastreo de Proteínas por medio de Electroforesis de Zonas Capilares con Pre - concentraciones Isotacoforéticas Transitorias en Columnas"). Electrophoresis (Electroforesis) 1993, 14, 417-428 (1993) describe dos formaciones de electrolitos para realizar una tITP.

**[0265]** Una configuración utiliza dos reservorios conectados por un capilar. El capilar y el reservorio están llenos con un electrólito líder (LE - leading electrolyte), mientras el segundo reservorio está lleno con un electrólito de terminación (TE - terminating electrolyte). La muestra para el análisis es inyectada primero al capilar lleno con LE y el extremo de inyección del capilar es insertado al reservorio que contiene el TE. Se aplica voltaje y aquellos componentes de la muestra que tienen movilidades intermedias a aquellos del LE y TE se apilan en zonas ITP agudas y alcanzan una concentración con un estado continuo. La concentración de aquellas zonas es relacionado a la concentración del co - ion LE pero no a la concentración del TE. Una vez que el estado continuo es alcanzado, el reservorio que contiene al TE es reemplazado con un reservorio que contiene LE. Esto causa un desaglutinamiento de las zonas ITP agudas, lo que permite a especies individuales el moverse en una modalidad electroforética por zonas.

**[0266]** La otra configuración discutida por Foret, F., et al. utiliza un método similar pero usa un solo electrólito de fondo (BGE - background electrolyte) en cada reservorio. La movilidad del co - ion BGE es baja de tal forma que puede servir como un ion de terminación. La muestra para análisis contiene co - iones adicionales con una movilidad electroforética tan alta que pueden servir como la zona de liderazgo durante la migración tITP. Después de que la muestra es inyectada al capilar y se ha aplicado voltaje, los iones líderes de más alta movilidad en la muestra forman un límite líder asimétrico y un límite trasero agudo. Justo atrás del límite trasero, se forma una discontinuidad conductiva, y esto resulta en un campo eléctrico no uniforme, y por lo tanto los iones de la muestra se aglutinan. En la forma en la que la migración progresa, la zona líder se ampliará debido a la dispersión de la migración de L y la concentración de la sal con movilidad más alta se reducida. El resultado son diferencias que se reducen del campo eléctrico a lo largo de las zonas de migración. A una cierta concentración de la zona de liderazgo, las bandas de la muestra se desaglutinarán y se moverán con velocidades independientes en una modalidad electroforética de zonas. El aislamiento de péptidos puede involucrar cualquier procedimiento conocido en la industria, tal como electroforesis capilar (por ejemplo, en un capilar o en un chip), o cromatografía (por ejemplo, en un capilar, en una columna o en un chip).

#### D. Procedimientos para la remoción de contaminantes

**[0267]** En algunas instancias, después del seguimiento de purificación primario para obtener un polipéptido de interés, pueden requerirse pasos de purificación secundarios para remover contaminantes. Los contaminantes

5 pueden ser inhibidores, sustancias que interfieren o amortiguadores inapropiados. En una instancia, la remoción de contaminantes se logrará al purificar específicamente su proteína de interés lejos de una mezcla compleja de moléculas biológicas. En otra instancia, la remoción de contaminantes se logrará al remover específicamente contaminantes de una muestra que contiene una proteína de interés. Por ejemplo, la proteína inmovilizada puede ser utilizada para remover selectivamente inmunoglobulinas de una muestra donde estas son consideradas como contaminantes. En otra instancia, se puede utilizar filtros para remover componentes no deseados de una muestra. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a cromatografía de exclusión por tamaño y membranas de ultrafiltración que separan moléculas en base a su tamaño y masa molecular. En otra instancia, la ultracentrifugación es utilizada para remover componentes no deseados de una muestra. La ultracentrifugación puede incluir centrifugación de una muestra mientras se monitorea con un sistema óptico la sedimentación (o su falta) de partículas. En otra instancia, se utiliza electrodiálisis para remover componentes no deseados de la muestra. La electrodiálisis es un proceso de electro membranas en el cual iones son transportados a través de membranas permeables de una solución a otra bajo la influencia de un gradiente potencial. Puesto que las membranas utilizadas en la electrodiálisis tienen la capacidad de transportar selectivamente iones que tienen carga positiva o negativa y rechazar iones de la carga opuesta, la electrodiálisis es útil para la concentración, remoción o separación de electrolitos.

### Remoción de Endotoxinas

20 **[0268]** En algunas instancias podría ser necesario el remover endotoxinas de la muestra. Endotoxina son componentes lipopolisacáridos pirógenos (LPS – pyrogenic lipopolysaccharide) de bacterias gram negativas. Puesto que estas bacterias son ubicuas, no es sorprendente que endotoxinas sean frecuentemente contaminantes de las preparaciones bioquímicas. Contaminación de endotoxinas usualmente es medido por unidades de endotoxinas (EU - endotoxin units), donde 1 EU corresponde a una concentración de endotoxinas (usualmente alrededor de 0.1 ng / kg de masa corporal (suficiente para generar una reacción pirógena). En una instancia, la remoción de endotoxinas es realizada por medio de ultracentrifugación. En otra instancia, la remoción de endotoxinas es realizada usando polimixina B inmovilizada. Los métodos para reducir los niveles de endotoxinas son conocidos para cualquier persona con conocimiento en la industria e incluye, pero no se limita a, técnicas de purificación utilizando cromatografías de soportes sílices, polvo de vidrio o hiperoxiapatita, fase reversa, afinidad, exclusión por tamaño, intercambio de aniones, cromatografía de interacción hidrofóbica y una combinación de estos métodos, y similares. Los métodos para medir los niveles de endotoxina son conocidos para cualquier persona con conocimiento normal en la industria e incluyen, pero no se limitan a, ensayos de lisados de Amebocitos Limulus (LAL - Limulus Amebocyte Lysate).

### Remoción de Detergente

35 **[0269]** En algunas instancias podría ser necesario el remover algo o todo el detergente en la muestra. Por ejemplo, aunque muchos polipéptidos solubles en agua son funcionales en formas solubles de detergente, otros polipéptidos pueden ser modificados e inactivados por la solubilización de detergentes. En una instancia, la remoción de detergentes puede ocurrir por medio de diálisis. La diálisis es efectiva para la remoción de detergentes que tienen altas CMCs (concentraciones micelares críticas) y / o pequeños números de aglutinamiento, tales como los glucósidos N-ocilos. En otra instancia, la remoción de detergente de una muestra puede ocurrir por medio de separación gradiente de densidad sacarosa. En otra instancia, los detergentes pueden ser removidos de la muestra por medio de cromatografía de exclusión por tamaño.

### 45 E. Polipéptidos Recombinantes

50 **[0270]** En una instancia, el aislamiento de los polipéptidos puede usar técnicas de ingeniería genética para sintetizar proteínas híbridas. Al fusionar la secuencia codificante de un polipéptido de interés con la secuencia codificante de un polipéptido con alta afinidad a un ligando, una proteína híbrida con un marcador de afinidad puede ser producido directamente por un microorganismo. Ejemplos de sistemas de expresión son Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, levadura, células de mamíferos y el sistema baculovirus en células de insectos. El marcador de afinidad puede ser utilizado para recuperar el producto de un medio de cultivo, lisado celular, extracto, cuerpos de inclusión, espacio periplásmico de las células anfitrionas, citoplasmo de células anfitrionas, u otro material por medio de cromatografía de afinidad.

55 **[0271]** En una instancia, los polipéptidos de aminoácidos no naturales que son secretados en el medio pueden ser obtenidos por medio de centrifugación o filtración. Estas soluciones pueden ser adecuadas para una aplicación directa a las columnas de cromatografía. En otra instancia, los polipéptidos que se acumulan intracelularmente son extraídos antes de la purificación por medio de cromatografía. En una instancia, los polipéptidos son extraídos por medio de interrupción celular. Ejemplos de técnicas de interrupción celular incluyen desintegradores mecánicos, tales como trituradores de esferas de vidrio y homogeneizadores de alta presión. En otra instancia, los polipéptidos son extraídos por medio de permeabilización celular. Ejemplos de agentes de permeabilización incluyen, pero no están limitados a, clorhidrato de guanidina y Triton X-100. Adicionalmente a la permeabilización química, las células pueden ser permeabilizadas por medio de lisis enzimática. La clarificación del extracto homogeneizado o crudo

celular obtenido después de la permeabilización celular puede ser realizado por medio de centrifugación o por métodos de filtración diferentes, tales como micro filtración o ultrafiltración.

5 **[0272]** Marcadores de purificación han sido desarrollados para ser aplicados en cromatografía de intercambio de iones, de interacción hidrofóbica, de afinidad, de inmunoafinidad, y de quelado de metales. Por ejemplo, los polipéptidos híbridos con un marcador de poliarginina pueden ser purificados por medio de cromatografía de intercambio iónico, péptidos híbridos con un marcador de polifenilalanina pueden ser aislados por medio de cromatografía hidrofóbica, péptidos híbridos con un marcador de  $\beta$ -Galactosidasa pueden ser aislados por medio de cromatografía de afinidad, péptidos híbridos con un marcador de proteína A pueden ser aislados por medio de cromatografía de afinidad de IgG, péptidos híbridos con un marcador antigénico pueden ser aislados por medio de cromatografía de inmunoafinidad y péptidos híbridos con una polihistidina pueden ser aislados por medio de cromatografía de quelado de metales. Los marcadores pueden ser removidos por medios químicos o enzimáticos. En algunas secciones, el marcador es removido por medio de una reacción intramolecular. Una molécula vinculante puede o no puede ser liberada.

15 **[0273]** Asimismo, aminoácidos no naturales pueden ser utilizados para generar marcadores de unificación y polipéptidos híbridos con estos marcadores pueden ser purificados utilizando técnicas de cromatografía u otras. En una sección, varios aminoácidos no naturales son incluidos en un terminal del polipéptido. La purificación de este polipéptido con varios aminoácidos no naturales puede realizarse por medio de cromatografía de afinidad o por otros medios dependiendo de las propiedades de los aminoácidos no naturales.

25 **[0274]** Para conjugar polipéptidos con varios marcadores de aminoácidos no naturales con otra molécula, el siguiente procedimiento puede ser realizado. Después de enlazar el polipéptido a una resina que vincula el marcador de aminoácidos no naturales, una reacción es realizada para conjugar el polipéptido a otra molécula tal como una PEG. El producto conjugado puede ser liberado de la resina como un resultado de conjugación o después de que la conjugación haya sido completada. La conjugación puede ser realizada bajo condiciones de desnaturalización y se puede replegar al polipéptido en la resina. La segunda molécula puede ser conjugada al polipéptido en un aminoácido natural o no natural presente en el polipéptido. La segunda molécula puede ser conjugada al polipéptido en un aminoácido natural o no natural presente en el marcador de aminoácidos no naturales.

30 **[0275]** En otra sección, los aminoácidos múltiples no naturales incluidos en un terminal del polipéptido son aminoácidos que se enlazan con metales. La purificación de este polipéptido puede realizarse usando métodos similares a aquellos utilizados para las proteínas marcadas His. En otra sección, el polipéptido comprende dos o más aminoácidos no naturales en los cuales uno o más aminoácidos no naturales son utilizados para enlazar al polipéptido a la resina y el segundo aminoácido no natural es utilizado para conjugar el polipéptido a otra molécula, incluyendo, pero sin limitarse a, una PEG. Otros materiales útiles en las técnicas de purificación pueden ser utilizados en vez de resinas. Los marcadores pueden ser removidos por medios químicos o enzimáticos. En algunas secciones, el marcador es removido por medio de una reacción intramolecular. Un enlazador puede ser liberado o no liberado.

40 **[0276]** En otra sección, un polipéptido híbrido puede tener un aminoácido no natural en la unión del polipéptido y del marcador. Este aminoácido no natural puede ser utilizado para separar al polipéptido del marcador por medio de una división química, por ejemplo durante o después del enlace del marcador a una columna. Este aminoácido no natural puede ser utilizado para separar el polipéptido del marcador por medio de una división enzimática o por medio de una reacción química intramolecular.

45 **[0277]** En otra sección, un método tipo "pro - medicamento" es utilizado. Un polipéptido de aminoácidos no naturales esta atado a una matriz de purificación, y una porción o todo el polipéptido es liberado después de un evento, incluyendo, pero sin limitarse a, una reacción intramolecular, exposición a luz ultravioleta (molécula activada por la luz para su liberación), división química o división enzimática.

50 **[0278]** En otra sección, un lugar de división específico en la unión entre las partes de un polipéptido podría introducirse. Esto permite, por ejemplo, la división de una molécula híbrida para producir la proteína de interés libre del marcador de afinidad. La remoción de una secuencia de fusión puede lograrse por medio de una división enzimática o química. Para dividir el marcador de afinidad del polipéptido de interés, un lugar específico de división química o enzimática puede ser diseñado en las proteínas de fusión. La remoción enzimática de las secuencias de fusión puede lograrse utilizando métodos conocidos a aquellas personas con conocimiento normal en la industria. La elección de la enzima para la remoción de la secuencia de fusión se determinará por medio de la identidad de la fusión, y las condiciones de reacción serán especificadas por la elección de la enzima tal como será aparente para aquellas personas con conocimiento normal en la industria. La división química puede ser lograda utilizando reactivos conocidos a aquellas zonas con conocimiento normal en la industria. La división química puede ser lograda utilizando reactivos conocidos por aquellas personas con conocimiento normal en la industria, incluyendo, pero sin limitarse a, bromuro de cianógeno, proteasa TEV, y otros reactivos. Ejemplos de reactivos de división incluyen, pero no se limitan a, ácido fórmico, hidroxilamina, colagenasa, factor Xa, enterocinasa, renina, carboxipeptidasa A y carboxipeptidasa B. El polipéptido dividido de la hGh puede ser purificado a partir de la secuencia de fusión dividida

y de los reactivos de división por medio de métodos conocidos para aquellas personas con conocimiento normal en la industria. Aquellos métodos serán determinados por medio de la identidad y las propiedades de la secuencia de fusión y el polipéptido, tal como será aparente a cualquier persona con conocimiento normal en la industria. Los métodos para purificación podrían incluir, pero sin limitarse a, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de intercambio iónico o diálisis o cualquiera de sus combinaciones.

**[0279]** Con un número creciente de terapias de proteínas y péptidos en desarrollo, existe una demanda para un método de purificación proteínico eficiente, económico y a larga escala que no sea costoso ni difícil de incrementar. Las resinas u otros materiales conocidos para aquellas personas con conocimiento en la industria pueden ser utilizados para aislar a los polipéptidos. La figura 10 muestra un ejemplo de un método de purificación para un polipéptido de aminoácidos no naturales utilizando una resina que reacciona con el aminoácido no natural. Un enlace covalente es formado entre un marcador de afinidad químicamente específico en la resina y un aminoácido no natural presente en la proteína. Aquellos enlaces son estables bajo una gama amplia de condiciones de pH y de purificación. El paso de preparación puede ser realizado en modalidades alternas, incluyendo, pero sin limitarse a, una modalidad de baño, que permite la purificación a larga escala. La resina y los marcadores de afinidad son físicamente y químicamente estables, y por lo tanto, pueden ser reutilizados para reducir el costo de la purificación proteínica a larga escala. La separación puede ser realizada en conjunto con una conjugación del polipéptido a las moléculas incluyendo, pero sin limitarse a, PEGs. Este método de “una olla” simplifica aún más el proceso de conjugación y reduce el costo de producción de las proteínas, incluyendo, pero sin limitarse a, las proteínas terapéuticas objetivo (figura 11). Las resinas pueden ser seleccionadas y funcionalizadas de acuerdo al aminoácido no natural presente en el polipéptido. La figura 12 muestra un ejemplo de selección de resina y su funcionalización. Las resinas u otras matrices para purificación pueden ser funcionalizadas con diferentes grupos funcionales dependiendo en el aminoácido no natural en el polipéptido. Por ejemplo, la figura 13 muestra un ejemplo de purificación de afinidad de un polipéptido de aminoácidos no naturales utilizando una resina de hidroxilamina. La figura 14 muestra un ejemplo de purificación de un polipéptido de aminoácidos no naturales utilizando una resina de aldehídos. La habilidad para regenerar la matriz utilizada en los métodos de purificación también suministra ventajas para la producción a larga escala.

**[0280]** En algunas instancias, el proceso de purificación cambia uno o más aminoácidos no naturales presentes en el polipéptido a uno o más aminoácidos naturales. La figura 15 muestra un ejemplo de purificación de proteínas naturales de un precursor de aminoácidos no naturales. El aminoácido no natural es convertido a tirosina después de liberar la resina utilizada en el proceso de purificación. La figura 16 muestra ejemplos no limitantes de aminoácidos no naturales.

**[0281]** Los aminoácidos no naturales presentes en un conjunto de dos o más proteínas pueden ser utilizados para purificar complejos de polipéptidos. Los aminoácidos no naturales pueden ser enlazados entre sí o juntados por medio de un simulador, un polímero u otra molécula para permitir la purificación de un complejo de polipéptidos. Los polipéptidos pueden ser aislados en esta forma incluyendo, pero sin limitarse a, varias subunidades de receptores o enzimas. Las técnicas utilizadas para aislar los complejos pueden utilizar uno o más aminoácidos no naturales adicionales presentes en uno o más de los polipéptidos. Las técnicas para aislar proteínas grandes son conocidas por personas que tienen experiencia en la industria. La disociación del complejo de polipéptidos puede ser realizado utilizando uno o más aminoácidos no naturales presentes en uno o más de los polipéptidos. Uno o más de los aminoácidos no naturales pueden reaccionar con otra molécula con un grupo funcional que causa la separación de los polipéptidos en el complejo.

**[0282]** En algunas instancias, los polipéptidos pueden formar un complejo debido al que las interacciones no covalentes que involucran a uno o más aminoácidos naturales presentes en el polipéptido.

**[0283]** En algunas instancias, la interacción electro / química puede causar campos eléctricos o magnéticos que pueden ser utilizados para purificar a los polipéptidos debidos a uno o más aminoácidos no naturales presentes en el polipéptido. En otras secciones, purificaciones o aislamientos de una sola célula se puede lograr utilizando un polipéptido de aminoácidos no naturales.

## **XII. Examinación de la biblioteca**

### **1. Examinación de alto caudal**

**[0284]** Los métodos tecnológicos para el proceso de examinación de los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos aquí descritos, incluyen, pero no se limitan a, sistemas de examinación que se basan en platos de varios pozos, sistemas de examinación que se basan en células, sistemas de examinación que se basan en micro fluidos y examinaciones de objetivos solubles en contra de componentes de medicamentos sintetizados en una fase sólida.

**[0285]** Los formatos automatizados de multipozos son desarrollados como sistemas de examinación de alto caudal. Sistemas automatizados de examinación que se basan en platos de 96 pozos son ampliamente utilizados. Los

sistemas de examinación que se basan en platos pueden ser hechos para reducir el volumen de los pozos de reacción aún más, por lo tanto, incrementando la densidad de los pozos por plato. Otros tipos de ensayos de alto caudal, tales como ensayos que se basan en células miniaturizadas también pueden ser utilizados en este invento. Los ensayos que se basan en células miniaturizadas tienen el potencial de generar datos de examinación para calidad y precisión, debido a su naturaleza in vivo. Los sistemas de examinación que se basan en micro fluidos que mide las reacciones in vitro en la solución utilizan canales de desde 10 hasta algunos cientos de micrómetros de ancho. Las micro bombas, el flujo electro - osmótico de las válvulas integradas y los dispositivos de mezcla controlan el movimiento de los líquidos a lo largo de la red de canales.

5  
10  
15 [0286] Las bibliotecas de examinación pueden ser agrupadas en forma de, solamente como ejemplo, Examinaciones Generales o que se Basen en Plantillas tales como grupos con mallas heterocíclicas comunes; dirigidas tales como selecciones que se basan en mecanismo, por ejemplo, quinasa tal como reactivos químicos que contienen compuestos que son asociados más frecuentemente con una actividad biológica más alta que la de otras estructuras; diversidad tal como la de compuestos preseleccionados de existencias disponibles con una máxima diversidad química; extractos vegetales; productos naturales / derivados de productos naturales, etcétera.

#### A. Bibliotecas químicas

20  
25  
30 [0287] Las bibliotecas químicas combinatorias son un medio para asistir en la generación de nuevos avances en compuestos químicos. Una biblioteca química combinatoria es una colección de compuestos químicos diversos generados por medio de síntesis química o síntesis biológica al combinar a varios "bloques estructurales" químicos tales como reactivos. Millones de compuestos químicos pueden ser sintetizados por medio de mezclas combinatorias de bloques estructurales químicos. LogP, masa molecular, número de donantes y aceptadores de enlaces H, tal como se establece en los requerimientos de "la regla de cinco" de Lipinski, ayudan a determinar candidatos fuertes para las características de los medicamentos. La "regla de cinco" de Lipinski requiere al compuesto tener estas propiedades: cinco o menos donantes de enlaces de hidrógeno, una masa molecular menor o igual a 500 Da, LogP calculado menor o igual a cinco), y 10 o menos aceptadores de enlaces de hidrógeno. Las tecnologías de examinación de alto caudal acopladas con las bibliotecas de compuestos obtenidas por medio de métodos de síntesis de alto caudal y / o química combinatoria pueden ser utilizados para identificar rápidamente y optimizar ligándos para aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos, tal como se describe en este documento.

35  
40 [0288] Las bibliotecas de diversidad química de compuestos orgánicos incluyen, pero no se limitan a: benzodiazepinas, diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y, síntesis orgánicas análogas de pequeñas bibliotecas de compuestos, bibliotecas oligoméricas tales como péptidos, glicinas de N-alquilo, policarbamatos y poliureas, oligocarbamatos, y / o fosfonatos de peptidilos, bibliotecas de hidratos de carbono, bibliotecas de compuestos quirales, y bibliotecas de moléculas pequeñas orgánicas. Una amplia variedad de bibliotecas de compuestos heterocíclicos han sido sintetizadas por medio de métodos de fases sólidas. Estos incluyen, en forma de ejemplos solamente, benzodiazepinas, pirrolidinas, hidantoínas, 1,4-dihidropiridinas, isoquinolinones, dicetopiperazinas, bencilpiperazinas, quinolonas, dihidro- y tetrahidroisoquinolinas, 4-tiazolidinonas, b-lactámicos, bencisotiazolonas, pirroles e imidazoles.

45  
50  
55 [0289] Las bibliotecas combinatorias de compuestos inorgánicos incluyen, pero no se limitan a, (a) óxidos de metales y elementos de grupos principales, incluyendo óxidos de metales de transición tales como zirconio, titanio, óxido de manganeso, óxidos de tierras raras tales como óxido de cerio y óxido de lantano; y los óxidos de estado sólido binario, ternario, y estados más complejos y fases cerámicas; diversas formas de alúmina, sílice, aluminosilicatos y aluminofosfatos; (b) formas naturales y sintéticas de aluminosilicato y de silicato tales como zeolitas ZSM-5, Beta, zeolita Y, y ferrierita, diversas formas de tamices moleculares tales como aluminofosfatos y titanosilicatos; arcillas naturales o sintéticas y minerales relacionados, tales como caolín, atapulgita, talco, montmorillonita y Laponite®; (c) Cerámicas sin óxido tales como carburos metálicos y nitruros; (d) varias formas de carbonos tales como carbones activados, tamices moleculares de carbono, grafitos, fullerenos, nanotubos de carbono, carbono negro; y (e) Varios polímeros orgánicos, oligómeros o resinas, tales como polietilenos, polipropilenos, poliestireno, poliamidas, polímeros de hidrocarburos halo, poliésteres; (f) metales tales como metales preciosos y / o metales de transición depositados, mezclados con o intercambiados a cualquier soporte tal como cualquiera de los materiales descritos en (a) – (e). Ejemplos de aquellas fases incluyen Pt / alúmina, Pd / alúmina y CuZSM-5.

#### B. Bibliotecas biológicas

60  
65 [0290] La biblioteca de péptidos usando micro - organismos.- Receptores de anticuerpos y células inmunológicas del sistema inmunológico son bibliotecas biológicas representativas. El sistema inmunológico, todos los procesos del diseño, la síntesis y la optimización de la biblioteca son controlados por los organismos en sí. Solo estructuras de la información de antígenos y genética para formar factores embrionarios son condiciones externas, pero el resto es controlado estructuralmente por medio de factores internos. Puesto que el sistema inmunológico utiliza bibliotecas estructurales proteínicas, estas son bibliotecas que usan aminoácidos como factores básicos.

Puesto que los péptidos o proteínas hechos de aminoácidos son los primeros productos de la síntesis por medio de la traducción de información genética, a través de tecnologías de ingeniería genética, las proteínas de las secuencias deseadas pueden ser obtenidas fácilmente al insertar la información genética modificada en microorganismos tales como bacterias y virus. La síntesis de las bibliotecas de microorganismos trae consigo varias ventajas. Es posible clonar microorganismos para hacer solamente de un tipo de proteínas por microorganismo, y aunque solo una célula es adquirida, el número de clones puede ser incrementado fácilmente por medio de multiplicación celular. La otra ventaja de utilizar microorganismos es que estos pueden auto propagarse cuando existe suficiente suministro. Después de sintetizar la cepa de ADN que hace la secuencia proteínica deseada, su cepa complementaria ya es sintetizada, por las enzimas si esto fuese necesario. Para qué el ADN sintetizado se replique y se traduzca apropiadamente de en microorganismos, éste necesita ser sacado con un vector e insertado en los microorganismos. El siguiente paso involucra que las proteínas se expresen la superficie de los microorganismos, para encontrar las proteínas deseadas.

**[0291]** Para hacer la biblioteca cierta información genética es necesaria. La síntesis aleatoria de ADN o el corte de cDNA de todo el ADN genómico de un organismo en particular pueden ser utilizados. Una porción de la secuencia de ADN que elabora cierta proteína puede ser modificada para hacer una biblioteca proteínica mutada en consideración de las limitaciones de volumen y las tasas de expresión de la incubación de microorganismos,  $10^9$  (1 billón) tipos de bibliotecas pueden realizarse. En comparación de  $10^6$  a  $10^7$  tipos de bibliotecas de síntesis, es un número enorme. El número de polipéptidos de 5 unidades es  $20^5$  (3.2 millones), aquel de las de 6 unidades es 64 millones, y para los péptidos de 7 unidades el número pasa de mil millones. Por lo tanto, si más de siete aminoácidos son cambiados, una biblioteca incompleta que no contiene todas las combinaciones posibles es realizada. Para proteínas largas, siete aminoácidos diferentes pueden ser seleccionados por separado y reemplazados cuando el ADN es sintetizado aleatoriamente, los códigos de ADN pueden ser repetidos y se pueden designar al mismo aminoácido, y la generación de cambios de frecuencia. Por lo tanto, para realizar las combinaciones posibles, una cantidad más alta de clones son requeridos.

**[0292]** Una biblioteca biológica combinatoria tal como una biblioteca de polipéptidos se forma al combinar un conjunto de bloques estructurales químicos llamados aminoácidos en todas las formas posibles para largo de compuesto dado (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto de polipéptidos). Las proteínas pueden ser miembros de una familia proteínica tal como una familia receptora (ejemplos: receptores de factores de crecimiento, receptores de catecolamina, receptores de derivados de aminoácidos, receptores de citoquinas, lecitina), familia de ligandos (ejemplos: citoquinas, serpinas), familia enzimática (ejemplos: proteasas, quinasas, fosfatasa, GTPasas similares a las hidrolasas), factores de transcripción (ejemplos: receptores de hormonas esteroideas, factores de transcripción del golpe de calor, dedo de zinc, cierre de leucina, homeodominio), proteasas de SIDA o proteasas del virus de hepatitis C (HCV - hepatitis C virus) y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (Fab, por ejemplo). Otros ejemplos son péptidos, péptidos codificados, biooligómeros aleatorios, dipéptidos, polipéptidos vinílogos, peptidomiméticos nonpeptidales con portadores de glucosa Beta D, bibliotecas de anticuerpos, y las bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos.

**[0293] Biblioteca bacteriófaga.-** Es una con número de métodos proteínicos de biblioteca. El bacteriófago vive en una bacteria anfitriona y un tipo del virus con materiales genéticos y cápsidas. Los virus M 13 y lambda son los más famosos

**[0294]** Un M13 es un virus delgado y largo y debido a su tamaño pequeño de su genoma, muchas bibliotecas pueden ser realizadas fácilmente. En contraste con otros virus, puede salir afuera de las células anfitrionas sin que se dañen o que se inhiba su crecimiento. Es conocido que M13 amplifica su información genética en la célula anfitriona y gasta a la capsida cuando emerge. Hace 10 tipos de proteínas y pVIII y capsidas son utilizadas usualmente en la síntesis bibliotecaria entre ellas. Una proteína pVIII rodea a todo el cuerpo y tiene alrededor de 50 aminoácidos. Usualmente 2700 por cada virus son expresadas. Puesto que el extremo amino sobresale hacia el exterior de la capsida, éste puede ser modificado para expresar un péptido diferente. Usualmente un péptido largo no puede ser expresado, pero es posible para péptidos de 6 unidades. Dado el gran monto de moléculas de la misma biblioteca que son expresados al mismo tiempo, a pesar de su tamaño relativamente pequeño, es apropiado para una reacción con varios ligandos. Una proteína de pastilla se expresa al extremo de un virus, y usualmente se expresan de tres a cinco proteínas de 406 aminoácidos. Puede expresar proteínas muy largas de tal forma que se ha usado para todas las bibliotecas proteínicas o de anticuerpos. Un anticuerpo normal utiliza Fab, una región de reconocimiento de antígenos, o una cadena Fvs. La biblioteca de bacteriófago y la hibridoma son los métodos más famosos para hacer anticuerpos. M13 es ideal para hacer bibliotecas de péptidos aleatorios y el virus es suficientemente estable para precipitarlo y concentrarlo para examinar bibliotecas  $10^9$  en un volumen de 1 - 10  $\mu$ l es posible.

**[0295]** En contraste con el M13, un virus lambda se cubre asimismo con una capsida en el citoplasma y sale de su célula anfitriona cuando existe un número suficiente, en vez de gastar una capsida cuando emerge. En otras palabras, si una proteína diferente es expresada, probablemente emergerá en una forma replegada con funciones apropiadas. Una proteína pV y D son utilizadas comúnmente para la síntesis bibliotecaria. Puesto que las proteínas pueden ser expresadas en la superficie del bacteriófago, existe un péptido aleatorio, fragmentos proteínicos



naturales, bibliotecas proteínicas connotaciones particulares y fragmentos de anticuerpos parciales y estos son utilizados como materiales de cromatografía, reacciones mutuas proteína - proteína, búsqueda de lugares para el enlace de receptores y descubrimientos de medicinas.

5 **[0296]** Muestra de fagos es una técnica utilizada comúnmente para hacer bibliotecas de péptidos. Estas bibliotecas de péptidos son utilizadas para examinar e identificar péptidos que tienen una actividad deseada particular, tal como la habilidad de enlazarse a otros péptidos u otras moléculas. En la muestra de fagos la biblioteca de péptidos es fusionada a la proteína bacteriófaga, comúnmente una proteína cobertora, que se muestra en la superficie del fago. La biblioteca del péptido que tiene el fago es contactada con un compañero de enlace inmovilizado, tal como una  
10 superficie celular o una proteína purificada, y los vinculadores específicos son aislados. Las técnicas y bibliotecas de muestras de fagos son descritas en las patentes de Estados Unidos números 5580717, 5702892, 5750344, 5821047, 5962255, 6140471, 6475806, 5427908, 5667988, 5733743, 5750373, 5824520, 6096551, 6225447, 6492160. La patente de Estados Unidos número 5,750,373 describe un método para seleccionar las proteínas nuevas tales como variantes de fragmentos de hormonas de crecimiento y de anticuerpos a las cuales se les ha alterado las propiedades de enlace para sus moléculas receptoras respectivas. El método incluye la fusión de la codificación genética de una proteína de interés al dominio terminal carboxi de la proteína cobertora genética III del fago filamentoso M13.

20 **[0297] Bibliotecas de bacterias y levaduras** - no solamente virus con cápsidas, pero también bacterias con paredes celulares y membranas pueden ser utilizadas para la expresión de una biblioteca también. Ambas, las bacterias gram positivas y gram negativas pueden ser utilizadas para expresar proteínas en la superficie celulares, y E. coli, una bacteria gram negativa, es utilizada comúnmente. La biblioteca de bacterias puede encontrar un antígeno que se enlaza fuertemente a un anticuerpo particular y lo utiliza como una vacuna, o puede expresar anticuerpos o bibliotecas receptoras para el análisis de ciertos materiales.

25 **[0298]** Se le llama modificación de traducciones a que las proteínas de animales más elevados sean modificados por medio de fosforilación o el aumento de azúcar después de la síntesis proteínica. Pero una bacteria, una procarionta, no tiene esa función, y aun cuando una proteína es sintetizada, se precipita debido a su mala solubilidad o se desactiva en la mayoría de casos. Por lo tanto, S. cerevisiae, una eucariota, es utilizada. Aunque S. cerevisiae es unicelular como las bacterias, tiene una función de modificación de traducciones y se pueden realizar proteínas muy similares a las originales.

30 **[0299]** A diferencia de los virus, estos tienen células de tamaños en micrones de tal forma que la FACS (organización celular activada por fluorescencia - fluorescence-activated cell sorting) puede ser utilizada. Las moléculas objetivo marcadas con fluorescencia son agregadas a la biblioteca de proteínas expresadas en una superficie celular y fluyen a través de los tubos de la máquina FACS. FACS organiza cada célula por colores e intensidades fluorescentes como vivas. Es posible examinar moléculas objetivas diferentes con colores diferentes y también es posible organizar las células de diferentes intensidades y selectividad. Otra ventaja es una examinación de fase líquida. No es necesario el separar fuertemente a las moléculas aferradas. Las células organizadas se multiplican nuevamente y estas son re-examinadas.

35 **[0300]** Las técnicas de muestras de superficie de levadura también son ampliamente utilizadas para producir y mostrar bibliotecas de péptidos. Las muestras de superficie de levadura pueden ser utilizadas en combinación con la organización celular activada por fluorescencia para seleccionar células que muestren para los péptidos deseados. Las técnicas de muestras de superficies de levadura y las bibliotecas son descritas en las patentes de Estados Unidos números 6083693, 6406863, 6410271, 6232074, 6410246, 6610472.

40 **[0301]** La muestra de la superficie bacteriana ha sido utilizada en una variedad de formas para mostrar péptidos en la superficie celular o en el periplasma. Una variedad de anfitriones bacterianos están disponibles para su uso en este sistema, tal como son una variedad de polipéptidos que se anclan a dominios para adherirse al péptido mostrado en la superficie celular. Las técnicas de muestras de superficies bacterianas y las bibliotecas están descritas en las patentes de Estados Unidos números 5348867, 5866344, 6277588, 5635182, 6180341.

45 **[0302]** Otros sistemas in vivo son utilizados para hacer bibliotecas de polipéptidos e identificar cambios en actividades, tales como la modulación de enlaces proteínicos objetivos, que resultan de cambios en secuencias de aminoácidos. Ejemplos de sistemas in vivo incluyen, pero no se limitan a, el sistema híbrido de dos levaduras (Schneider, S et al., Nat. Biotechnol., 17, 170-175 (1990)), y el ensayo de complemento de fragmentos proteínicos reductasa de dedihidrofolato (Pellitier, N.J. et al., Nat. Biotechnol., 17, 683-690, (1990)).

50 **[0303] Vista panorámica biológica** - Una biblioteca de microorganismos sintetizados puede ser utilizada para encontrar un polipéptido que se enlaza con una molécula particular con una alta afinidad.

55 **[0304]** Moléculas objetivas, tales como aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos, tal como se mencionan en este documento, pueden ser colocados en una forma uniforme en el plato de pruebas. La biblioteca de microorganismos preparada  
60

puede ser añadida al plato. Sólo los microorganismos que se enlazan fuertemente a las moléculas objetivas permanecerán y el resto quedarán en la solución. Después de un rato, los organismos no enlazados pueden ser descartados, y después los microorganismos enlazados en una forma débil o accidentalmente serán lavados con soluciones apropiadas. La afinidad de enlace de las moléculas objetivo determinarán el proceso de lavado. Los microorganismos que todavía permanezcan serán separados por medio de la adición de moléculas objetivos concentradas con un bajo o alto pH, y la cantidad es amplificada por medio de re - incubación. A veces podría ser difícil el separarlas sin matar las bacterias cuando la afinidad es demasiado fuerte. Si es un bacteriófago, en vez de una separación, se puede infectar a la célula anfitriona directamente. Puesto que todavía puede existir algunos microorganismos no deseados enlazados accidentalmente, los primeros organismos amplificados podrían ser objeto de exámenes repetidas y procesos de amplificación para incrementar el número de clones que contienen a las proteínas vivas. Finalmente, después de ser incubadas en concentraciones bajas, cada clon podría ser separado y usualmente decenas de clones podrían ser seleccionados y utilizados para análisis secuenciales de ADN. Esto es exitoso si las estructuras de los péptidos provenientes de la información de ADN son reconocibles y la mayoría de los clones muestra secuencias que van acorde con los péptidos. Sin embargo, puesto que las proteínas pueden tener toxicidad hasta los niveles de los clones y la expresión de ADN puede variar, existe una posibilidad que se seleccionen clones que se multiplican más rápido y que se han expresado bien en vez de los resultados de exámenes deseados. Por lo tanto, un paso de confirmación es necesario para la medida de la síntesis y afinidad de enlace del péptido.

**[0305]** La tecnología de bibliotecas proteínicas de microorganismos usa fundamentalmente la habilidad de auto reproducción de organismos vivos. Eso es, al amplificar (alimentar) una cantidad pequeña de moléculas candidatas obtenidas, se puede incrementar la pureza y la cantidad.

**[0306] Muestra de ribosomas** - las técnicas de muestra de ribosomas y muestra de ARNm también son ampliamente utilizadas para hacer bibliotecas de péptidos. Las muestras de ribosomas y las muestras de ARNm son técnicas in vitro que acoplan el ARNm que codifica a un péptido con el péptido codificado en el ribosoma o utilizando puromicina. Las técnicas de muestra de ribosomas y muestras de ARNm y las bibliotecas son descritas en las patentes de Estados Unidos números 6416950, 6436665, 6602685, 6660473, 6429300, 6489116, 6623926, 6589741, 6348315, 6207446, 6258558, 6416950, 6440695, 6228994, 6281344, 6429300, 6660473, 5580717, 5688670, 6238865, 6261804, 6518018, 6281344, 6258558, 6214553.

**[0307] Biblioteca de ADN, ARN** - El desarrollo de la tecnología de amplificación de PCR, ADN, ha permitido el usar ácidos nucleicos como bibliotecas. Puesto que los ADN y los ARN son hechos de 4 unidades, 10 oligómeros tienen 410 (alrededor de  $10^6$  igual a 1 millón) de tipos y 20 bibliotecas de oligómeros pueden tener alrededor de 1012. Al usar sintetizador de ADN de fase sólida automatizada, el extremo 5' y el extremo 3' están fijos en una secuencia y A, T, C, y G son colocados aleatoriamente puesto que cada uno toma alrededor del 25% de la secuencia. Cuando una cepa está hecha, puede ser replicada al usar enzimas o amplificada por medio de PCR. Comúnmente, alrededor de 1014 - 15 moléculas son hechas y utilizadas, pero ocasionalmente existen alrededor de 40 lugares (1024 tipos) para su introducción aleatoria, a veces en 10 con un conjunto incompleto para la biblioteca. Para la biblioteca de ADN, los ADN en sí son utilizados simplemente, pero para la biblioteca de ARN, se necesita la polimerasa ARN T7 para la transcripción.

**[0308]** Las bibliotecas preparadas son organizadas por medio de exámenes de enlaces moleculares objetivos; amplificadas por medio de PCR para ADN y por medio de RT-PCR para ARN. Aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos tal como se los presenta en este documento, pueden ser utilizados como moléculas objetivas. Exámenes y amplificaciones de la biblioteca amplificada se repiten hasta que el número de inicio de  $10^{14-15}$  es reducido a algunos cientos, y entonces las secuencias de moléculas candidatas adquiridas son analizadas y cada afinidad de enlace es medida. A aquellos ADN y ARN adquiridos se les llama aptámeros, y muestran una afinidad fuerte hacia las moléculas objetivas proteínicas. El aptámero inhibe la función in vivo de la molécula objetiva, pero es destruida rápidamente por medio de nucleasas in vivo. Para resolver el problema, algunas partes de la biblioteca son sustituidas con apoyos nucleicos artificiales para incrementar la resistencia en contra de las nucleasas.

**[0309]** Algunos ejemplos de bibliotecas biológicas incluyen, pero no se limitan a, la Biblioteca de Lípidos Bioactivos; la Biblioteca de Endocannabinoides -Compuestos que tienen actividad en los receptores cannabinoide (CB) y en el vaniloide (VR) que incluyen varias clases de ligados, por ejemplo, Amidas, Etanolamidas, Lipo-aminoácidos, Acil-Gabas y Acil-dopaminas etc.; Biblioteca de Bioactivos Conocidos, tales como, los ligados de GPCR, moduladores de segundos mensajeros, ligados de receptores nucleares, moduladores de actina y tubulina, inhibidores de quinasa, inhibidores de la proteasa, bloqueadores de los canales iónicos, agentes de regulación genética, inhibidores de la biosíntesis de lípidos, etc.; Biblioteca de ligados de Canales Iónicos; Biblioteca de inhibidores de Quinasa / fosfatasa; Biblioteca de Productos Naturales – los productos naturales son una fuente sin igual de la diversidad química y son un punto de partida ideal para cualquier programa de detección para las pequeñas moléculas farmacológicamente activas; Biblioteca de Neurotransmisores - ligados de receptores CNS, tales como, Adrenérgicos, dopaminérgicos, Serotonérgicos, opioides (y ligados Sigma), colinérgicos, Histaminérgicos (y ligados de Melatonina), Glutamatergicos ionotrópicos, Glutamatergicos metabotrópicos, GABAérgicos, y

Purinergicos (y adenosinas) etc.; Biblioteca de Ligandos Receptores Nucleares – La Biblioteca de Ligandos Receptores Nucleares contiene compuestos con los receptores nucleares. Agonistas y antagonistas de los receptores se pueden incluir; Biblioteca de Ligandos Huérfanos – La biblioteca de Ligandos Huérfanos contiene compuestos con actividad biológica, pero cuyos compañeros de enlaces proteínicos no han sido identificados. Por ejemplo, Aminas de rastreo, metabolitos de neurotransmisores,  $\beta$ -carbolinas endógenas, metabolitos urinarios, congéneres de nicotina, y aminoácidos D, etc.

## 2. Métodos de examinación

**[0310]** En este documento se presentan métodos para identificar agentes candidatos que enlazan a una proteína o actúan como un modulador de las características de enlace o actividad biológica de una proteína. Se pueden realizar ensayos en varias formas incluyendo la examinación de una biblioteca de polipéptidos de aminoácidos no naturales con una molécula conocida o viceversa. En una instancia, el método es realizado en tubos de pruebas individuales o en una escala modesta. En otra instancia, el método es realizado simultáneamente en varios ensayos. Por ejemplo, el método puede ser realizado al mismo tiempo en varias mezclas de ensayos en un plato de examinación de varios pozos. Por lo tanto, tal como se muestra en este documento es un sistema de examinación de alto caudal. En referencia a ensayos para interacciones, en una instancia, lecturas de fluorescencia o absorción son utilizadas para determinar la actividad. Otras actividades biológicas a ser ensayadas, en forma de ejemplo, exclusivamente, son la acetilación, carboxilación, acilación, fosforilación, defosforilación, ubiquitinación, glicosilación, la modificación de lípidos, -ribosilación ADP, biodisponibilidad y vida media.

**[0311]** Existen muchos métodos conocidos para aquellas personas con conocimiento en la industria que también suelen ser utilizados para la detección de interacción entre un polipéptido de aminoácidos naturales y otra molécula dentro de un ensayo de examinación. Estos métodos podrían incluir, en forma de ejemplo solamente, ensayos de enlaces fluorescentes, ensayos de cambios térmicos, ensayos de cambios de movilidad electroforética, ensayos de enlaces proteína - proteína, ensayos de examinación bioquímica, ensayos inmunológicos (es decir inmunoprecipitaciones) y ensayos que se basan en células (es decir, dos o tres examinaciones híbridas, descenso GST, sistema TAP-TAG (TOPA – MARCA)), ensayos de expresión, ensayos de enlaces proteína - ADN, ensayos funcionales (ensayos de fosforilación, etcétera) y similares. Refiérase, por ejemplo, a la patente de Estados Unidos número 6,495,337. Otros métodos también podrían incluir sistemas de chips proteínicos que pueden examinar enzimas, proteínas receptoras o anticuerpos que ayudan a realizar estudios de interacción de proteína - proteína, estudios de enlaces de ligandos o ensayos inmunológicos (MacBeath y Schreiber, Science (Ciencia) 2000 289: 1760-1763). Otra instancia podría involucrar, medicamento de perfil que puede tener un efecto en las células intactas, que son introducidas con polipéptidos de aminoácidos no naturales funcionales, sondeando la fisiología celular utilizando coloraciones fluorescentes para el ADN y otras proteínas conocidas por interactuar con el polipéptido de aminoácidos no naturales y utilizar imágenes generadas por microscopios fluorescentes para medir los cambios en el comportamiento celular (Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L., Mitchison, T.J. (1999). Science. (Ciencia) 286, 971-4.).

**[0312]** En particular, existen muchos métodos por medio de los cuales la detección de la vinculación de un ligando de prueba a un polipéptido de aminoácidos no naturales (y, por lo tanto, por medio de los cuales la identificación de un ligando de los polipéptidos de aminoácidos no naturales) puede ejecutarse. Métodos útiles son aquellos por los cuales el polipéptido de aminoácidos no naturales replegado puede ser distinguido de un polipéptido de aminoácidos no naturales desplegado. Los métodos descritos a continuación, en forma de ejemplos solamente, algunos de los medios que se pueden utilizar para hacer esto. En cada caso, el método de detección es ejecutado como una combinación de pruebas (probando la combinación entre el ligando y el polipéptido de aminoácidos no naturales) después de que haya pasado suficiente tiempo para el enlace de un polipéptido de aminoácidos no naturales a su ligando y en una combinación de control (que es la misma que la combinación de prueba excepto que no hay ningún ligando presente).

### A. Métodos para Determinar la Presencia de un Polipéptido de Aminoácidos No Naturales Replegados

**[0313]** En este método, un ligando de prueba puede ser combinado con un polipéptido de aminoácidos no naturales para el cual un ligando (es decir, una gente que enlaza al polipéptido de aminoácidos no naturales) debe ser identificado. La combinación resultante es una combinación de prueba del ligando con el polipéptidos de aminoácidos no naturales o una combinación de prueba. En general, el ligando de prueba está presente en montos molares excesivos, en relación al polipéptido de aminoácidos no naturales. Este método puede ejecutarse en una solución o en algunas secciones del método, el polipéptido de aminoácidos no naturales puede estar presente en una fase sólida (por ejemplo, conectado, covalentemente por medio de un enlace o de otra forma a una esfera). El ligando de prueba y el polipéptido de aminoácidos no naturales son combinados bajo condiciones (por ejemplo, temperatura, pH, concentración salina tiempo) apropiadas para enlazar al polipéptido de aminoácidos no naturales al ligando. Adicionalmente, las condiciones bajo las cuales el ligando de prueba y el polipéptido de aminoácidos no naturales son combinados de tal forma que, para un polipéptido de aminoácidos naturales que se despliega irreversiblemente, una fracción substancial del polipéptidos de aminoácidos no naturales está presente en la ausencia de ligando de prueba en la forma desplegada, aunque la fracción suele variar, dependiendo del método de

5 detección utilizado. En el caso de un polipéptido de aminoácidos no naturales que se despliega irreversiblemente, las condiciones, generalmente, son que el polipéptido de aminoácidos no naturales se despliega a una tasa sustancial en la ausencia del ligando. Estas condiciones son escogidas para asegurar que el polipéptido de aminoácidos no naturales se despliega a una magnitud apropiada; por lo tanto, la señal observada (por ejemplo, la digestión por parte de una proteasa; la fuerza de enlace al anticuerpo, la chaperonina o superficie) pueden ser medidas convenientemente. Si muy poco del polipéptido de aminoácidos no naturales es desplegado, la señal observada ocurrirá a un nivel o tasa demasiado baja para poder medirlo convenientemente. Para cada combinación de ligando - polipéptido de aminoácidos no naturales evaluada, las condiciones bajo las cuales este método es ejecutado serán determinadas empíricamente, utilizando métodos conocidos. Aquellas condiciones incluyen la temperatura de reacción y los agentes caotrópicos o los desnaturalizantes utilizados. La temperatura a la cual el método es ejecutado es determinado por el polipéptido de aminoácidos no naturales que está siendo utilizado y puede determinarse empíricamente utilizando métodos conocidos. Para ajustar u optimizar la fracción del polipéptido de aminoácidos no naturales desplegado, condiciones de desnaturalización pueden ser requeridas para algún polipéptido de aminoácidos no naturales. Aquellas condiciones de desnaturalización podrían incluir el uso de temperaturas elevadas, la adición de proteínas desnaturalizantes (por ejemplo, urea, o anilina) a la mezcla de incubación o el uso de ambas. Adicionalmente, la estabilidad de parte del polipéptido de aminoácidos no naturales puede ser ajustada por medio de la ingeniería de sustituciones de aminoácidos desestabilizantes o estabilizantes en el polipéptido de aminoácidos no naturales. El ligando de prueba y el polipéptido de aminoácidos no naturales son combinados, mantenidos bajo condiciones apropiadas y durante tiempo suficiente para enlazar al polipéptido de aminoácidos no naturales a un ligando. El tiempo necesario para enlazar al polipéptido de aminoácidos no naturales al ligando variará dependiendo del ligando de prueba, del polipéptido de aminoácidos no naturales y de otras condiciones utilizadas. En algunos casos, el enlace ocurrirá instantáneamente (por ejemplo, esencialmente en forma simultánea con la combinación del ligando de prueba y el polipéptido de aminoácidos no naturales), mientras que en otras, la prueba resultante de la combinación entre el ligando y el polipéptidos de aminoácidos no naturales es mantenida por un período más largo de tiempo antes de que se detecte el enlace. En el caso del polipéptido de aminoácidos naturales que se despliega irreversiblemente, las tasa de despliegue también debe ser tomada en cuenta para determinar un tiempo apropiado para el enlace del ligando de prueba. El enlace de un ligando de prueba a un polipéptido de aminoácidos no naturales es evaluado en una de las siguientes formas: al determinar la magnitud con la cual el polipéptido de aminoácidos no naturales plegado está presente en la prueba de la combinación del ligando y de los polipéptidos de aminoácidos no naturales; al determinar la manera en la cual el polipéptidos de aminoácidos no naturales desplegado está presente en la combinación de prueba en el ligando y el polipéptido de aminoácidos no naturales o al determinar la tasa de polipéptidos de aminoácidos no naturales plegados en comparación a los péptidos de aminoácidos no naturales desplegados en la combinación. Es decir, se determina la diferencia entre el monto de polipéptidos de aminoácidos no naturales plegados, el monto de polipéptidos de aminoácidos no naturales desplegados o la tasa de polipéptidos de aminoácidos no naturales plegados a los polipéptidos de aminoácidos no naturales desplegados en la presencia del ligando de prueba y en su ausencia. Si un ligando de prueba enlaza al polipéptido de aminoácidos no naturales (es decir, si el ligando de prueba es un ligando para el polipéptido de aminoácidos naturales), existirán más polipéptidos de aminoácidos no naturales plegados y menos polipéptidos de aminoácidos no naturales desplegados (y, por lo tanto, una tasa más alta de polipéptidos de aminoácidos no naturales plegados a desplegados y una tasa más baja de polipéptidos de aminoácidos no naturales desplegados a plegados) que estén presentes en la ausencia del ligando de prueba que enlaza al polipéptido de aminoácidos no naturales. No es necesario el determinar la cantidad o la fracción de polipéptidos de aminoácidos no naturales plegados y desplegados. Sólo es necesario el saber que existe una diferencia en el monto lo de proteínas plegadas o desplegadas (un cambio en el equilibrio de las dos formas) en la presencia y ausencia de un ligando o un cambio en la tasa de despliegue. Esta diferencia puede ser determinada al comparar la magnitud en la cual el polipéptido de aminoácidos no naturales plegados y / o desplegados está presente en la combinación de prueba (combinación de prueba entre el ligando y el polipéptido de aminoácidos naturales) con la magnitud con la cual están presentes en una combinación de control (el polipéptido de aminoácidos no naturales en la ausencia del ligando de prueba). Alternamente, para despliegues reversibles, la diferencia entre la magnitud la cual las dos formas ocurren en la ausencia de un ligando de prueba puede evaluarse al determinar su ocurrencia inicialmente (por ejemplo, antes de la adición de un ligando de prueba a una solución de polipéptidos de aminoácidos no naturales o a una proteína de nueva vinculada a un soporte sólido) y entonces después de que el ligando de prueba ha sido combinado con el polipéptidos de aminoácidos no naturales bajo condiciones apropiadas para que ocurra el enlace entre el ligando y el polipéptido de aminoácidos no naturales. De cualquier forma, la determinación de las dos formas del polipéptido de aminoácidos no naturales puede ejecutarse utilizando una variedad de métodos, los cuales son descritos más adelante. Un ligando de prueba que ha demostrado por medio de este método el enlazar a un polipéptido de aminoácidos naturales es denominado un ligando del polipéptidos de aminoácidos no naturales.

#### 60 1. Determinación del enlace del ligando utilizando proteólisis

[0314] En una sección de este método, la fuerza de enlace del ligando de prueba a un polipéptido de aminoácidos no naturales es detectada por medio del uso de proteólisis. En esta sección, una proteasa que actúa preferencialmente en el polipéptido de aminoácidos no naturales es combinada con la combinación de prueba entre el polipéptido de aminoácidos no naturales y el ligando (combinación de prueba) y la mezcla resultante de la

combinación de prueba y la proteasa es ensayada después de un período apropiado de incubación, utilizando uno de los métodos descritos en detalle más adelante, para determinar la diferencia entre el polipéptido de aminoácidos no naturales intacto o degradado en la presencia y en la ausencia del ligando de prueba. Un ensayo idéntico es realizado en una combinación de prueba entre el polipéptido de aminoácidos no naturales y el ligando y en una combinación de control y los resultados de los dos ensayos son comparados. Más proteínas degradadas o menos proteínas degradadas en la combinación de prueba que en la combinación de control indica que el ligando de prueba ha enlazado al polipéptido aminoácidos no naturales y que, por lo tanto, indica que el ligando de prueba es ligando del polipéptido de aminoácidos no naturales. Asimismo, una tasa más alta de polipéptidos de aminoácidos no naturales intactos en comparación de la proteína degradada en la combinación de prueba que en el control indica que el ligando de prueba es un ligando del polipéptido de aminoácidos no naturales.

**[0315]** Una amplia variedad de proteasas, tales como la tripsina, la quimotripsina, la proteasa V8, la elastasa, la carboxipeptidasa, la proteinasa K, la termolisina y subtilisina pueden ser utilizadas en esta sección. Sólo es necesario que la proteasa utilizada pueda actuar (hidrolizar los enlaces de los péptidos de (el polipéptido de aminoácidos no naturales utilizado bajo las condiciones de incubación escogidas y que esta acción sea dirigida preferiblemente hacia la forma desplegada de la proteína. Para evitar interferencia por los ligandos objetivos que inhiben directamente a la proteasa, más de una proteasa pueden ser utilizadas simultáneamente en ensayos paralelos.

**[0316]** Para que los enlaces de los péptidos eligieran eficientemente, el sustrato de péptidos - el polipéptido de aminoácidos no naturales - debe tener acceso al lugar activo enzimático de la proteasa escogida. Puesto que los átomos en una molécula proteínica plegada están empaquetados a formar apretada, la mayoría de los enlaces péptidos susceptibles son bloqueados estéricamente para que no puedan ingresar a un lugar activo de proteasas cuando la proteína está en estado plegado. En el estado desplegado, los enlaces de péptidos están más expuestos y por lo tanto son relativamente más susceptible a la acción de la proteasa.

**[0317]** Consecuentemente, la adición de un ligando de prueba que enlaza al polipéptido de aminoácidos no naturales desplegado, estabilizándolo en la forma de proteasa - resistente, cambia la tasa de la proteólisis. Por lo tanto, al incubar el ligando de prueba con el polipéptido de aminoácidos no naturales, añadiendo una proteasa para degradar preferencialmente a las proteínas desplegadas, y entonces utilizar un ensayo para cuantificar los polipéptidos de aminoácidos no naturales intactos o degradados, es posible estimar si el ligando de prueba enlaza a los polipéptidos de aminoácidos no naturales, y, por lo tanto, es un ligando del polipéptido de aminoácidos no naturales, indicando que es potencialmente y terapéuticamente útil.

**[0318]** Alternamente, la proteasa puede ser intrínseca a la muestra del polipéptido de aminoácidos no naturales no purificado o parcialmente purificado.

## 2. Determinación del Enlace del Ligando por medio de Detección del Enlace Superficial

**[0319]** En otra sección de este método, la propensión de las proteínas desplegadas para adherirse a las superficies es utilizada. Esta sección se basa en el hecho que las doctrinas plegadas son mantenidas en formaciones tridimensionales específicas y, por lo tanto, no es muy posible que sus contrapartes desplegadas se adhieran a la superficie. Un ligando de nueva se enlaza a un polipéptido de aminoácidos no naturales (es decir, es un ligando del polipéptido de aminoácidos no naturales), estabilizará la forma plegada del polipéptido de aminoácidos no naturales. Por lo tanto, la habilidad del ligando de prueba para enlazarse a un polipéptido de aminoácidos no naturales puede determinarse al evaluar la magnitud con la cual el polipéptido de aminoácidos no naturales está enlazado a una superficie sólida apropiada en la presencia y en la ausencia del ligando de prueba. Los métodos descritos en detalle más adelante pueden ser utilizados para este propósito.

**[0320]** En esta sección, el polipéptido de aminoácidos no naturales, un ligando de prueba y una superficie que enlaza preferencialmente a la proteína desplegada se combinan y se mantienen bajo condiciones apropiadas para su enlace del polipéptido de aminoácidos no naturales a un ligando y enlazando el polipéptido de aminoácidos no naturales desplegado a la superficie. Existen numerosas superficies adaptadas para este propósito, incluyendo platos de micro titulación construidos de una variedad de plásticos tratados o no tratados, platos tratados para cultivos de tejidos o enlaces proteínicos elevados de filtros de nitrocelulosa y filtros PVDF.

**[0321]** Si un ligando de prueba enlaza al polipéptido de aminoácidos no naturales, más polipéptidos de aminoácidos no naturales plegados y menos polipéptidos de aminoácidos no naturales desplegados estarán presentes en la combinación de prueba entre el ligando y el polipéptido de aminoácidos no naturales en comparación con la combinación de control. Eso es, en la presencia de un ligando de prueba que es un ligando para un polipéptido de aminoácidos no naturales, menos proteínas desplegadas estarán disponibles para enlazar una superficie que enlaza preferencialmente a la proteína desplegada que en la ausencia de un ligando para el polipéptido de aminoácidos no naturales. La determinación del monto de la superficie enlazada al polipéptido de aminoácidos no naturales o el monto del polipéptido de aminoácidos no naturales que permanece en la solución puede ejecutarse usando uno de los métodos descritos más adelante. Si más polipéptidos de aminoácidos no naturales están desvinculados de la

superficie (es decir, si más polipéptidos de aminoácidos no naturales están en la solución) en la presencia de un ligando de prueba que en la ausencia del ligando de prueba, el ligando de prueba es un ligando del polipéptido de aminoácidos no naturales. La tasa de polipéptidos de aminoácidos no naturales en la solución en comparación con los polipéptidos de aminoácidos no naturales enlazados a la superficie es mayor si el ligando de prueba es un ligando para el polipéptido de aminoácidos no naturales que si no lo fuese. En contraste, la tasa de los polipéptidos de aminoácidos no naturales en la solución en comparación con los polipéptidos de aminoácidos no naturales vinculados a la superficie es mayor si un ligando de prueba es un ligando para el polipéptido de aminoácidos no naturales que si no lo fuese.

### 3. Determinación del Enlace del Ligando Utilizando Enlaces de Anticuerpos

**[0322]** En una tercera sección de este método, la magnitud con la cual el polipéptido de aminoácidos no naturales plegado y desplegado está presente y, por lo tanto, el enlace del ligando de prueba al polipéptido de aminoácidos no naturales, son evaluados por medio del uso de anticuerpos específicos dirigidos únicamente en contra del estado desplegado ("anticuerpos específicos desnaturalizados" o "anticuerpos DS (denatured-specific)") o del estado plegado ("anticuerpos específicos naturales" o "anticuerpos NS (nature specific)"). Cuando un polipéptido de aminoácidos no naturales está en el estado plegado, y estabilizado en ese estado por el ligando de prueba que es un ligando para el polipéptido de aminoácidos no naturales, la afinidad de enlace aparente del anticuerpo DS será reducida (Breyer, (1989) "Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to the N-terminal Domain of the Lambda Repressor" ("Producción y Caracterización de Anticuerpos Monoclonales del Dominio de la Terminal N del Represor Lambda"), J. Biol. Chem., 264(5):13348-13354) y aquella del anticuerpo NS será incrementada. Si el enlace del anticuerpo DS al polipéptido de aminoácidos no naturales es menos o si el enlace del anticuerpo NS es mayor en la presencia de un ligando de prueba que en la ausencia del ligando de prueba ese será un ligando del polipéptido de aminoácidos no naturales.

**[0323]** Existen métodos numerosos conocidos en la industria para producir anticuerpos que se enlacen a proteínas específicas (Harlow, E. & D. Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (ANTICUERPOS: UN MANUAL DE LABORATORIO), Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Para preparar anticuerpos específicos para el estado desnaturalizado, se puede inmunizar a animales con un péptido de una región de la proteína que está enterrada en el estado natural. Si la estructura de la proteína es desconocida, los anticuerpos pueden ser preparados en contra de varios péptidos y entonces los anticuerpos podrán ser examinados en búsqueda de enlaces preferenciales al estado desnaturalizado. La producción de anticuerpos es realizada por medio de técnicas estándar, tales como la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales descrito en detalle en Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (Anticuerpos Monoclonales: Un Manual de Técnicas), CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1987).

**[0324]** Existen por lo menos 3 métodos básicos por medio de los cuales se pueden utilizar anticuerpos DS y NS para detectar un cambio inducido por un ligando en la ocurrencia de polipéptidos de aminoácidos no naturales plegados, la ocurrencia de proteínas desplegadas o la tasa de lo uno en comparación de lo otro.

**[0325]** En un método, una solución de prueba que contiene el anticuerpo DS dirigido en contra del polipéptido de aminoácidos no naturales desplegado, el polipéptido de aminoácidos no naturales, y el ligando de prueba es incubado, en un plato de micro titulación cubierto con el polipéptido de aminoácidos no naturales desnaturalizados o uno de sus fragmentos de péptidos, bajo condiciones apropiadas para enlazar al polipéptido de aminoácidos no naturales con su ligando y enlazar el anticuerpo DS al polipéptido de aminoácidos no naturales desplegado. Una solución de control, que es la misma que la solución de prueba excepto que no contiene al ligando de prueba, es procesada en la misma forma que la solución de prueba. Al comparar el monto de los anticuerpos adheridos al plato o el monto remanente en la solución en las soluciones de prueba y de control, la diferencia de plegamiento del polipéptido de aminoácidos no naturales es detectado. El monto de anticuerpos adheridos al plato o el remanente en la solución puede ser medido tal como se describe más adelante.

**[0326]** En un segundo método, una solución de prueba que contiene al anticuerpo DS, el ligando de prueba y el polipéptido de aminoácidos no naturales es incubada en un plato cubierto con un segundo anticuerpo, denominado un anticuerpo de la fase sólida, que no puede vincularse al polipéptido de aminoácidos no naturales simultáneamente con el anticuerpo DS, y es específico para el polipéptido de aminoácidos no naturales, pero es específico para, el estado plegado ("específico natural" o "anticuerpo NS (native specific)") o no podrá diferenciar entre los estados natural y desnaturalizado ("sin diferenciación" o "anticuerpo ND (non-differentiating)"). La combinación o solución de prueba resultante es mantenida bajo condiciones apropiadas para la vinculación del polipéptido de aminoácidos no naturales con un ligando del polipéptido de aminoácidos no naturales y para la vinculación de los anticuerpos a las proteínas que estos reconocen (son específicos para estos). Una solución de control, que es la misma que la solución de prueba excepto que no contiene al ligando de prueba, es procesada en la misma forma que la solución de prueba. En ambas soluciones, el polipéptido de aminoácidos no naturales desnaturalizado (desplegado) enlaza al anticuerpo DS y es inhibido para que no se vincule al anticuerpo de fase sólida. La habilidad del ligando de prueba para vincular al polipéptido de aminoácidos no naturales puede ser medida al determinar el monto de polipéptidos de aminoácidos no naturales que se vinculan al anticuerpo de la fase sólida en la solución de prueba y comparándola con la magnitud en la cual el polipéptido de aminoácidos no naturales se

vincula al anticuerpo de la fase sólida en la ausencia del ligando de prueba, que a su vez refleja el monto del polipéptido de aminoácidos no naturales en el estado plegado. El monto de polipéptidos de aminoácidos no naturales vinculados al plato por medio del anticuerpo secundario o remanente en la solución puede detectarse por medio de métodos descritos más adelante. Este método puede ser utilizado en una forma comparable con el anticuerpo NS como el anticuerpo en la solución y el anticuerpo DS o ND en la fase sólida.

[0327] Un tercer método, es una solución de prueba que contiene al polipéptido de aminoácidos no naturales y el ligando de prueba es incubado en un contenedor, tal como un pozo de micro titulación que ha sido cubierto con un anticuerpo DS o NS y mantenido bajo condiciones apropiadas para la vinculación del polipéptido de aminoácidos no naturales a su ligando y para vincular el anticuerpo al polipéptido de aminoácidos no naturales. Alternamente, el anticuerpo puede estar presente en la superficie de las esferas. La habilidad del ligando de prueba para vincularse al polipéptido de aminoácidos no naturales es medido al determinar la magnitud con la cual el polipéptido de aminoácidos no naturales permanece en la solución (desvinculado del anticuerpo) o en la superficie sólida (vinculado al anticuerpo), o la tasa entre los dos, en la presencia y en la ausencia del ligando de prueba. Si el ligando de prueba vincula al polipéptido de aminoácidos no naturales (es un ligando del polipéptido de aminoácidos no naturales), existirán menos polipéptidos de aminoácidos no naturales adheridos aún anticuerpo DS o menos en la solución para el anticuerpo NS) de los que están vinculados al anticuerpo en la solución de control. En otra sección, el anticuerpo puede estar presente en la solución y el polipéptido de aminoácidos no naturales puede estar adherido a la fase sólida, que puede ser una superficie de un plato o la superficie de una esfera.

#### 4. Determinación de la Vinculación de un Ligando Utilizando Chaperones Moleculares

[0328] En una cuarta sección de este método, se utilizan chaperones moleculares para determinar la vinculación de un ligando de prueba a un polipéptido de aminoácidos no naturales. Los chaperones son una variedad de proteínas que vinculan a proteínas desplegadas como parte de su función fisiológica normal. Éstos están generalmente involucrados en el montaje de proteínas oligoméricas, asegurando que ciertas proteínas se doblan correctamente, facilitan la ubicación proteínica y previenen la formación de aglutinamiento proteínico durante el estrés fisiológico. Hardy, (1991) "A Kinetic Partitioning Model of Selective Binding of Nonnative Proteins by the Bacterial Chaperone SecB (Un Modelo de Partición Cinética de Enlaces Selectivos de Proteínas No Naturales por parte de los Chaperones Bacterianos SecB)", Ciencia 251:439-443. Estas proteínas tienen la capacidad de interactuar con muchas proteínas parcialmente desnaturalizadas o desplegadas sin un reconocimiento específico de los motivos secuenciales definidos.

[0329] Un chaperón molecular, encontrado en *E. coli*, es SecB. SecB ha demostrado su participación en la exportación de un subconjunto de proteínas no relacionadas de otra forma experimentos de competencia han demostrado que SecB se vincula fuertemente a todas las proteínas desplegadas que ha sido probadas, incluyendo proteínas que están fuera de su subconjunto de exportación particular, pero parece no interactuar con las proteínas dobladas.

[0330] En esta sección, una solución de prueba contiene al ligando de prueba y al objetivo y es incubada en un plato de micro titulación u otra superficie adecuada cubierta con chaperones moleculares, bajo condiciones apropiadas para la vinculación del polipéptido de aminoácidos no naturales con su ligando y vinculando a los chaperones moleculares utilizados para el polipéptido de aminoácidos no naturales desplegados. El polipéptido de aminoácidos no naturales desplegado en la solución tendrá una tendencia mayor a vincularse a la superficie cubierta con chaperones moleculares en relación al polipéptido de aminoácidos no naturales doblado estabilizado por ligandos. Por lo tanto, la habilidad del ligando de prueba para vincular al polipéptido de aminoácidos naturales puede determinarse al establecer el monto de polipéptidos de aminoácidos no naturales remanentes sin vinculación, o el monto vinculado a la superficie cubierta de chaperones, utilizando los métodos detallados más adelante.

[0331] Alternamente, un ensayo de competencia para vincular a los chaperones moleculares puede ser utilizado. Una solución de prueba que contiene un polipéptido de aminoácidos no naturales, el ligando de prueba y un chaperón molecular puede ser incubado en un contenedor, tal como un pozo de micro titulación cubierto con un polipéptido de aminoácidos no naturales desnaturalizado (desplegado), bajo condiciones apropiadas para vincular el polipéptido de aminoácidos no naturales con su ligando y vincular a los chaperones moleculares al polipéptido de aminoácidos no naturales desplegado. Una solución de control que es la misma que la solución de prueba excepto que no contiene al ligando de prueba se procesa en la misma forma. El polipéptido de aminoácidos no naturales desnaturalizado en la solución se vinculará a la chaperonina y, por lo tanto inhibida su vinculación al polipéptido de aminoácidos no naturales desnaturalizado adherido a la superficie del contenedor (la superficie del pozo de micro titulación). La vinculación de un ligando de prueba a un polipéptido de aminoácidos no naturales resultará en un monto más pequeño de polipéptidos de aminoácidos no naturales desplegados, y, por lo tanto, más chaperones estarán disponibles para vincularse al polipéptido de aminoácidos no naturales desnaturalizado en la fase sólida que en el caso de la ausencia de vinculación del ligando de prueba. Por lo tanto, la vinculación del ligando de prueba puede determinarse al evaluar a los chaperones vinculados a la superficie o en la solución de prueba e I<sub>D</sub> la solución de control y comparando los resultados. La vinculación de los chaperones al polipéptido de aminoácidos no naturales desnaturalizado en la fase sólida en una mayor magnitud en la solución de prueba que en la solución de

control es una indicación de la vinculación del polipéptido de aminoácidos no naturales con el ligando de prueba (es decir, es indicativo de la identificación de un ligando del polipéptido de aminoácidos no naturales). En este ensayo, los chaperones moleculares en general, no son provistos en exceso, para que la competencia de su adherencia puede ser medida.

5 **[0332]** Alternamente, la solución de prueba que contiene al polipéptido de aminoácidos no naturales, al ligando de prueba y al chaperón molecular puede ser incubado en un contenedor, tal como un pozo de micro titulación, cuya superficie está cubierta con antisera o un anticuerpo mono clónico específico para el polipéptido de aminoácidos no naturales plegado (anticuerpo NS) y no puede vincularse al polipéptido de aminoácidos no naturales adherido al chaperón. El polipéptido de aminoácidos no naturales desplegado vinculará al chaperón en la solución y por lo tanto estará inhibido de adherirse al anticuerpo de la fase sólida. Al detectar a polipéptidos de aminoácidos no naturales en la solución o adheridos a las paredes del pozo y comparar la magnitud en un control apropiado (la misma combinación sin el ligando de prueba), la habilidad del ligando de prueba para vincularse al polipéptido de aminoácidos no naturales puede ser determinada. Si el ligando de prueba es un ligando apropiado para el polipéptido de aminoácidos no naturales, más polipéptidos de aminoácidos no naturales estarán adheridos a la antisera o al anticuerpo monoclonal adherido a la superficie el contenedor en la solución de prueba que en la solución de control. Adversamente, menos polipéptidos de aminoácidos no naturales estarán presentes desvinculados (en la solución) en la solución de prueba que en la solución de control. La detección y comparación de los polipéptidos de aminoácidos no naturales adheridos, de los polipéptidos de aminoácidos no naturales no adheridos o la tasa entre los dos en la solución de prueba y la solución de control indicará si el ligando de prueba es un ligando para el polipéptido de aminoácidos no naturales o no.

#### 5. Determinación de la Adherencia del Ligando a través de Medidas de Aglutinación Proteínica

25 **[0333]** Entre más alta es la fracción de la proteína en la forma plegada, es mayor el monto de proteína que está disponible para adherirse a un ligando que se vincula exclusivamente al estado plegado consecuentemente, si una proteína tiene un ligando conocido, es posible incrementar la adherencia de la proteína al ligando conocido al agregar un ligando que se vincula en otro sitio de la proteína. En este método, un ligando que es conocido por vincularse al polipéptido de aminoácidos no naturales es inmovilizado en un sustrato sólido. Una solución que contiene al polipéptido de aminoácidos no naturales es agregada entonces, junto con el ligando o los ligandos de prueba. Un incremento en el monto del polipéptido de aminoácidos no naturales que vincula al ligando inmovilizado en comparación a un ensayo idéntico en la ausencia del ligando de prueba indica que el ligando de prueba se adhiere al polipéptido de aminoácidos no naturales. El monto del polipéptido de aminoácidos no naturales adherido al sustrato sólido puede ser evaluado por medio de muestras del sustrato sólido o por medio de muestras de la solución, utilizando los métodos de detección señalados más adelante.

#### 6. Determinación de la Adherencia del Ligando por medio de Medidas de Aglutinamiento Proteínico

40 **[0334]** Para proteínas que se despliegan irreversiblemente, las proteínas desplegadas a menudo forman aglutinaciones insolubles. La magnitud de aglutinamiento proteínico puede medirse por medio de técnicas que se señalan más adelante tales como dispersión luminosa, centrifugación y filtración. En este método, el polipéptido de aminoácidos no naturales y el ligando de prueba son incubados y el monto de aglutinamiento proteínico es medido durante el tiempo o después de un tiempo de incubación fijo. La magnitud del aglutinamiento proteínico en la mezcla de prueba es comparado a la misma medida para un ensayo de control en la ausencia del ligando de prueba si un ligando de prueba se adhiere a un polipéptido de aminoácidos no naturales, la tasa de despliegue del polipéptido de aminoácidos no naturales será menor en la ausencia del ligando de prueba. Para medidas al pasar del tiempo, la tasa de incremento de las proteínas desplegadas y por lo tanto de las proteínas aglutinadas será menor si el ligando de prueba es un ligando apropiado para el polipéptido de aminoácidos no naturales que si no lo fuese. Para medidas en un tiempo fijo, existirán menos proteínas desplegadas y por lo tanto menos proteínas aglutinadas si el ligando de prueba es un ligando apropiado para el polipéptido de aminoácidos no naturales que si no lo fuese. Por lo tanto, la habilidad de un ligando de prueba para adherirse a un polipéptido de aminoácidos no naturales puede determinarse al evaluar la matriz del aglutinamiento proteínico en la presencia y en la ausencia del ligando de prueba.

#### XIV. Técnicas de Detección Proteínica

55 **[0335]** Los métodos conocidos en la industria para detectar la presencia o ausencia de proteínas, péptidos pequeños o aminoácidos libres pueden ser utilizados en este método para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. El método utilizado puede determinarse por el producto (proteínas, péptidos, aminoácidos libres) a ser detectado. Por ejemplo, técnicas para detectar el tamaño de las proteínas pueden ser utilizados para determinar la magnitud de la degradación proteolítica del polipéptido de aminoácidos no naturales. Marcación por radio, marcación fluorescente, y marcación vinculada a enzimas pueden detectar la presencia o ausencia en una solución o un sustrato por medio de las medidas de la radiactividad, fluorescencia o actividad enzimática. Métodos inmunológicos pueden detectar la presencia o ausencia de un polipéptido de aminoácidos no naturales conocido en una solución o en un sustrato tal como la adherencia de un anticuerpo específico para aquella proteína. La figura 1a presenta a varias técnicas de



detección proteínica que pueden ser utilizadas para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos.

#### A. Microscopio de Fluorescencia

**[0336]** Los métodos para la detección proteínica aquí descritos, incluyendo al microscopio de fluorescencia para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. El microscopio de fluorescencia es una técnica de microscopio utilizada ampliamente que permite a la composición molecular de las es rupturas que están siendo observadas ser identificadas por medio del uso de sondas marcadas en una forma fluorescente una especificidad química alta. Aquellas ondas pueden ser anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o polipéptidos que se vinculan a antígenos que comprenden a un aminoácido no natural. Un microscopio de fluorescencia puede ser utilizado en estudios de especímenes fijos. Para proteínas que puedan ser extraídas y purificadas en abundancia razonable, un fluoróforo puede conjugarse a una proteína y la conjugación puede ser introducida a una célula. Un fluoróforo puede ser conjugado a un aminoácido no natural en el polipéptido. Se asume que el análogo fluorescente se comporta como la proteína natural y puede, por lo tanto, servir para revelar la distribución o el comportamiento de esta proteína en las células. Junto con NMR, espectroscopia infrarroja, dicroísmo circular y otras técnicas, el decaimiento de fluorescencia intrínseca proteínica y su observación asociada de anisotropía fluorescente, neutralización colisional y transferencia de energía de resonancia son técnicas claves para la detección proteínica.

**[0337]** La medición del decaimiento de fluorescencia permite que se observen directamente la dinámica de los cambios estructurales en una proteína que va a ser observada directamente. Además, el proceso de excitación de la fluorescencia natural de las proteínas que emana desde la tirosina y el triptófano de los aminoácidos elimina la posibilidad de una perturbación del entorno local cuando se utiliza sondas fluorescentes extrínsecas.

**[0338]** Un desarrollo en el uso de sondas fluorescentes para estudios biológicos ha sido la utilización de proteínas naturalmente fluorescentes como sondas fluorescentes. Colorantes que ocurren naturalmente, denominadas proteínas fluorescentes (GFP, YFP, CFP, TOPAS, GFT, RFP), fueron descubiertas en los años posteriores de la década de los 90 (Clontech, USA). Estos colorantes son distinguidos por su influencia reducida en especímenes. Ellos, por lo tanto, son particularmente adecuados para la marcación de las regiones celulares en preparaciones vivas.

**[0339]** La medusa *Aequorea victoria* produce una proteína naturalmente fluorescente conocida como la proteína fluorescente verde (GFP - green fluorescent protein). La fusión de estas sondas fluorescentes a una proteína objetivo permite la visualización por medio del microscopio de fluorescencia y la cuantificación por medio de citometría de flujo. Puesto que son codificadas genéticamente y no requieren cofactores auxiliares, los marcadores GFP pueden ser utilizados para analizar la expresión proteínica y su ubicación en células vivas y en organismos completos. El gen para esta proteína ha sido clonado y puede ser transfectado a otros organismos. Los marcadores GFP pueden ser utilizados para ubicar regiones en las cuales un gen particular es expresado en un organismo, o para identificar la ubicación de una proteína específica. En muchos casos, estas proteínas quiméricas preservan su función original. Por lo tanto, es a menudo posible, por ejemplo, el usar esta técnica para visualizar la distribución intracelular de una proteína, incluyendo, pero sin limitarse a, una proteína citoesquelética. Con la GFP se pueden observar muestras sin colorante o no fijas. En este momento existen algunas variantes de GFP que suministran colores de emisión separables espectralmente. Las mutaciones de GFPs han resultado en versiones de emisión de luz fluorescente de color azul, ciano y amarillo. Proteínas fluorescentes que pueden ser utilizadas para marcar a estos péptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, la proteína fluorescente verde (GFP - green fluorescent protein), la proteína fluorescente ciano (CFP - cyan fluorescent protein) la proteína fluorescente roja (RFP - red fluorescent protein), la proteína fluorescente amarilla (YFP - yellow fluorescent protein), la GFP mejorada (EGFP - enhanced GFP), la YFP mejorada (EYFP - enhanced YFP), y similares. Nuevas versiones de GFP han sido desarrolladas por medio de mutaciones, incluyendo un ADN GFP "humanizado", el producto proteínico del cual se incrementado la síntesis en células de mamíferos (por favor refiérase a, Cormack, et al., (1996) *Gene (Gen)* 173, 33-38; Haas, et al., (1996) *Current Biology (Biología Actual)* 6, 315-324; y Yang, et al., (1996) *Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos)* 24, 4592-4593). Una de esas proteínas humanizadas es la "proteína fluorescente verde mejorada" (EGFP - enhanced green fluorescent protein). La GFP, sus variantes u otros colorantes que ocurren naturalmente pueden ser acoplados a polipéptidos de aminoácidos no naturales.

**[0340]** La GFP puede ser utilizada como un sensor biológico, que reporta los resultados de los niveles iónicos o el pH por medio de fluorescencia en formas características. Una molécula que puede ser utilizada para detectar el nivel de iones de zinc es una proteína fluorescente que se muestra como el registro 1kys del PDB (Protein Data Bank - Banco de Datos Proteínicos). La proteína resplandece dos veces en una forma brillante creando una señal visible fácilmente detectable una vez que el zinc se enlaza al cromóforo modificado. La construcción de otro sensor biológico de péptidos y de proteínas que contienen a un aminoácido no natural puede exhibir propiedades de fluorescencia alteradas en respuesta a los cambios en su entorno como el estado oligomérico, conformación en el momento de su enlace con el ligando, estructura o enlace directo del ligando. Biomoléculas fluorescentes marcadas

apropiadamente permiten una detección espacial y temporal de las reacciones bioquímicas dentro de las células vivas. Refiérase, por ejemplo, a Giuliano, K. A., et al., Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1995, 24:405-434; Day, R. N. Mol. Endocrinol. 1998, 12:1410-9; Adams, S. R., et al., Nature 1991, 349:694; Miyawaski, A., et al., Nature (Naturaleza) 1997, 388:882-7; Hahn, K., et al., Nature (Naturaleza) 1992, 359:736; Hahn, K. M., et al., J. Biol. Chem. 1990, 265:20335; y Richieri, G. V., et al., Mol. Cell. Biochem. 1999, 192:87-94. La patente de Estados Unidos número 6,951,947, discute los sensores biológicos y fluoróforos que detectan cambios ambientales.

**[0341]** Actualmente la tecnología es conducida por nuevas aplicaciones de sondas existentes y el diseño y la síntesis de sondas nuevas e innovadoras. Algunas de las ondas son las siguientes:

**[0342] Marcadores:** La sensibilidad y la seguridad (en comparación con métodos radioactivos) de la fluorescencia ha sido usada cada vez más y más para la marcación de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas. Aparte de fluoresceína, existen otros marcadores fluorescentes que cubren todo el rango desde 400 a 820 nm. En forma de ejemplo solamente, algunos de los marcadores incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína y sus derivados, carboxifluoresceínas, rodaminas y sus derivados, marcadores Atto, alternativas rojas fluorescentes y naranja fluorescentes: Cy3 / Cy5™, complejos lantánidos con vidas útiles largas, marcadores de longitud de onda larga - hasta de 800 nm, marcadores de cianina DY, proteínas Phycobili. Las moléculas fluorescentes que son capaces de absorber radiación en una longitud de onda y emitir radiación a una longitud de onda más larga, incluyen, pero no se limitan a Alexa-532, Hidroxicumarina, aminocumarina, metoxicumarina, cumarina, Cascada Azul, Amarillo Lucifer, P-ficoeritrina, R - ficoeritrina, (PE), conjugaciones PE-Cy5, conjugaciones PE-Cy7, Rojo 613, fluoresceína, BODIPY-FL, BODIPY TR, BODIPY TMR, Cy3 , TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, PerCP, rojo Texas, Cy5, Cy7, Alofocianina (APC - Allophycocyanin), TruRed (rojo verdadero), conjugaciones APC-Cy7, verde Oregón, etrametilrodamina, Dansilo, Dansilo aziridina, Indo-1, Fura-2, FM 1-43, DiIC18 (3), carboxi-SNARF-1, NBD, Indo-1, Fluo-3, DCFH, DHR, SNARF, monoclorobimano, calceína, N- (7- nitrobenz-2-oxa-1,3 -diazol-4-il) amina (NBD), ananilnonaptanele, deproxilo, ftalamida, amino ftalamida pH, dimetilamino-naftalensulfonamida, sondas comparables a Prodan, Lordan o acrilodan y sus derivados. Colorantes fluorescentes cumarina incluyendo, por ejemplo, amino metilcumarina, 7-dietilamina-3- (4 '- (1-maleimidilo) fenil) -4- metilcumarina (CPM) y N- (2- (1-maleimidilo) etil) 7- dietilaminocumarin-3-carboxamida (MDCC). Otras moléculas útiles incluyen aquellas que muestran una transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET - fluorescence resonance energy transfer). Muchas parejas tales como donante - aceptador son conocidas, e incluyen fluoresceína para rodamina, cumarina para la fluoresceína o rodamina. Etc. otra clase de parejas de marcadores útiles incluyen parejas centralizadoras de fluoróforo en las cuales el segundo grupo es neutralizador, que reduce la intensidad de la fluorescencia del grupo fluorescente. Algunos neutralizadores conocidos incluyen grupos acrilamida, átomos pesados tales como yoduro y bromato, marcadores de spin de nitróxido tales como TEMPO, etcétera. Los marcadores tales como estos pueden ser conjugados a polipéptidos de aminoácidos no naturales.

**[0343]** Los fluoróforos que son conjugados con un polipéptido de aminoácidos no naturales pueden resplandecer todo el tiempo o sólo cuando el polipéptido está vinculado a un objetivo. Otros tipos de fluoróforos incluyen:

**[0344] Conjugaciones:** En forma de ejemplo solamente, algunas conjugaciones e incluyen, pero no se limitan a, conjugaciones de isotiocianato, conjugaciones de estreptavidina, y conjugaciones de biotina. Conjugaciones de anticuerpos han sido usadas ampliamente para rastrear biomoléculas en células vivas y organismos enteros. Pueden ser generadas con especificidades para, virtualmente, cualquier epítipo y son, por lo tanto, en principio, aplicables para la toma de imágenes de un amplio rango de moléculas. Las conjugaciones incluyen, pero no se limitan a, conjugaciones de anticuerpos que puede contener aminoácidos no naturales.

**[0345] Sustratos Enzimáticos:** Los sustratos enzimáticos incluyen, no se limitan a, sustratos fluorogénicos y cromogénicos.

**[0346] Micro y Nano Partículas:** Varias técnicas permiten la preparación de una amplia variedad de microesferas fluorescentes que varían en tamaño, química matricial, tipo de fluorocromo, intensidad de fluorescencia y grupos funcionales superficiales. En forma de ejemplo solamente, algunos de los Fluorocromos utilizados son: FITC (fluorescencia verde, excitación / emisión = 506 / 529 nm), Rodamina B (fluorescencia anaranjada, excitación / emisión = 560 / 584 nm), Nilo azul A (fluorescencia roja, excitación / emisión = 636 / 686 nm).

**[0347]** Las nanopartículas fluorescentes son herramientas prometedoras para el almacenamiento de información óptica y otras aplicaciones técnicas, como por ejemplo, en las áreas bioquímica, bioanalítica, médica y biológica. Métodos actuales médicos y biológicos de tomas de imágenes fluorescentes se basan principalmente de en marcadores colorantes, los cuales son limitados en lo que se refiere a emisión de luz por molécula, así como en lo que se refiere a foto estabilidad. Las nano partículas superan esos problemas ofreciendo una fluorescencia fuerte y estable. Las nano partículas se basan en diferentes materiales, tales como, el poliacrilonitrilo y el poliestireno, etc.

**[0348] Rotores Moleculares:** Los rotores moleculares fluorescentes son sensores de restricción microambiental que se vuelven fluorescentes sólo si su rotación es restringida. El cambio de intensidad fluorescente es causada por la restricción de la relajación rotacional intramolecular sobre el enlace donante - receptor de los fluoróforos. Ejemplos

de restricciones moleculares incluyen, pero no se limitan a, coloración entre cada (aglutinamiento), enlaces de anticuerpos, o un enclaustramiento en la polimerización de la actina.

5 **[0349] Marcadores IEF:** IEF (enfoque isoeléctrico - Isoelectric Focusing) es una herramienta analítica poderosa para la separación de anfólitos, principalmente proteínas. Para asegurar el alto rendimiento del análisis, se necesitan estándares de pl (marcadores pl). Una ventaja de la electroforesis de gel IEF con marcadores fluorescentes IEF es la posibilidad de observar directamente la formación del gradiente. Un marcador IEF fluorescente también puede ser detectado por medio de absorción UV a 280 nm (20 °C).

10 **[0350]** Cualquiera o todas de estas sondas fluorescentes pueden ser utilizadas para la detección de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. La figura 9 presenta ejemplos no limitantes de moléculas que se adhieren específicamente a lugares de las proteínas por medio de la formación de oximas entre carbonilos de aminoácidos no naturales incorporados a un polipéptido y la hidroxilamina de la molécula. Las moléculas mostradas son fluoróforos, biotina y queladores.

15 **[0351] Reportadores Químicos Bio - Ortogonales:** Las moléculas pequeñas tienen un mejor acceso a los compartimientos intracelulares y extravasculares. Su utilización como agentes tomadores de imágenes requiere un medio para dirigir selectivamente a la sonda pequeña a una biomolécula deseada. La funcionalidad nucleófila ocurre en la mayoría de tipos de biopolímeros, lo que permite una derivación fácil con biotina, fluoróforos, y muchas otras moléculas pequeñas reportadoras. Protocolos establecidos de bioconjugación han hecho a estas operaciones triviales para polímeros purificados in vitro. Es una estrategia alterna para marcar a biomoléculas que combina la simplicidad de marcadores genéticamente codificados con la especificidad de la marcación de anticuerpos y la versatilidad de sondas de moléculas pequeñas. Éste método involucra la incorporación de una funcionalidad química única - un reportador químico bioortogonal - A una molécula objetivo utilizando la propia maquinaria biosintética de la célula. Reportadoras químicas bioortogonales son controles químicos no naturales no perturbadores que pueden ser modificados en sistemas vivos por medio de reacciones altamente selectivas con sondas entregadas en una forma exógena. Este proceso de marcación de dos pasos puede ser utilizado para revestir a una molécula objetivo para su detección o aislamiento, dependiendo de la naturaleza de la sonda.

30 **[0352]** Ejemplos de reacciones de acoplamiento bioortogonal incluyen, pero no se limitan a, la ligación Staudinger de azidas con triarilfosfinas, la reacción de cetona / aldehído-hidralazina, y la cicloadición 1,3-dipolar azida - alquino de Huisgen. El reemplazo del marcador fluorescente voluminoso con un grupo de azidas estéricamente inconspicuo puede suministrar sondas que son más capaces de distribuirse en una forma imparcial dentro de células vivientes, tejidos u organismo. Asimismo, el efecto variable y a menudo antagonista del marcador fluorescente en una sonda que enlaza afinidad para proteínas específicas también es eliminado. Finalmente, el uso de química de ciclo adición de azida - alquino puede coordinar la síntesis de la sonda al remover la necesidad de generar y purificar grandes cantidades de reactivos marcados con fluoróforos estructuralmente diversos. Reacciones de acoplamiento que utilizan polipéptidos de aminoácidos no naturales pueden suministrar sondas que son alternativas a los polipéptidos marcados fluorescentemente. La cicloadición 1,3-dipolar azida - alquino de Huisgen puede ser utilizada para adherir otras moléculas o suministrar otros métodos para la purificación o detección de polipéptidos.

40 **[0353]** Las bibliotecas de péptidos pueden ser sintetizadas en soportes sólidos y, usando receptores colorantes, soportes sólidos con colorantes que pueden ser seleccionados uno a uno. Si los receptores no pueden indicar un color, sus anticuerpos enlazados pueden ser colorados. Puesto que es posible el separar soportes sólidos por medio de pinzas bajo microscopios o incluso bajo lupas, el método puede ser utilizado en receptores proteínicos, y también en ligandos vinculantes o receptores artificiales sintetizados e incluso examinando ligandos nuevos que vinculan a metales. Este método es útil para buscar nuevos compuestos, porque permite la examinación de un monto grande de compuestos.

50 **[0354]** Sin embargo, la determinación de actividad dependiendo en la intensidad de la coloración puede no ser precisa, y un gran monto de soportes sólidos puede que no siempre sean tratados uno a uno. Por lo tanto, métodos automatizados para examinación de alto caudal (HTS - high throughput screening) es requerido y un método FACS (Organizador Celular Activado por Fluorescencia - Fluorescence Activated Cell Sorter) puede ser utilizado. Esta máquina originalmente pasa a las células por medio de un tubo capilar y separa a las células al detectar sus intensidades fluorescentes. El mismo método puede ser utilizado en soportes sólidos en vez de células. Puesto que este método está diseñado para células, resinas pequeñas del tamaño de células pueden ser pasadas, pero soportes sólidos de tamaño normal (50-200  $\mu$ moles) necesitan máquinas especialmente modificadas. El aislamiento parcial o completo de compuestos también puede realizarse. Para el aislamiento parcial de compuestos, se puede utilizar una foto descomposición de tiempo controlado o varios grupos funcionales para dividirse en condiciones diferentes. Mientras tanto, se puede dispersar soportes sólidos en agar y aislar algunos de los compuestos por medio de foto descomposición. Los compuestos aislados pueden dispersarse alrededor de soportes sólidos para que la examinación y la separación en el soporte sólido puedan realizarse.

## 65 B. Ensayos Inmunológicos

[0355] Los métodos para detección proteínica aquí descritos, incluyen ensayos inmunológicos para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. Los ensayos inmunológicos combinan los principios de química e inmunología permitiendo pruebas científicas, por ejemplo, ensayos inmunológicos de enzimas e inmunotransferencia para una detección específica y sensible de los analitos (aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos) de interés. El principio básico de estos ensayos es la especificidad de la reacción anticuerpo – antígeno. Similarmente el Western blot, una proteína individual puede ser identificada por su anticuerpo mediante una inmunotransferencia. Ensayos inmunológicos de vinculación competitiva pueden ser hechos en donde los analitos compiten con un antígeno marcado para una agrupación limitada de moléculas de anti corpus (por ejemplo, ensayos radio inmunológicos, EMIT). Ensayos inmunológicos pueden ser no competitivos de tal forma que el anticuerpo esté presente en exceso y sea marcado. Un antígeno analito es incrementado, el monto del complejo anticuerpo - antígeno marcado también se incrementa (por ejemplo, ELISA). Los anticuerpos pueden ser policlónicos si estos son producidos por una inyección de antígenos a un animal experimental, o monoclonales si son producidos por una fusión celular y técnicas de cultivo celular. En los ensayos inmunológicos el anticuerpo funciona como un reactivo específico para el antígeno analito. El antígeno puede ser polipéptido de aminoácidos no naturales, un polipéptido de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos). Por otro lado, los anticuerpos o sus fragmentos utilizados en los ensayos inmunológicos pueden ser polipéptidos de aminoácidos no naturales, y pueden ser utilizados para la detección de antígenos que podrían comprender o no comprender un aminoácido no natural.

[0356] Algunos de los tipos de ensayos inmunológicos son, en forma de ejemplo solamente, RIAs (ensayos radio inmunológicos - Radioimmunoassay) y ensayos inmunológicos de enzimas similares a ELISA (ensayo inmuno absorbente vinculado con enzimas - Enzyme-linked immunosorbent assay), EMIT (Técnica de Ensayos Inmunológicos Multiplicados de Enzimas - Enzyme Multiplied Immunoassay Technique), y Ensayos Inmunológicos Enzimáticos de Micropartículas (MEIA - Enzyme Multiplied Immunoassay Technique), LIA (ensayo inmunológico luminiscente - luminescent immunoassay) y FIA (ensayo inmunológico fluorescente - fluorescent immunoassay) estas técnicas pueden ser utilizadas para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. Los anticuerpos, ya sean utilizados como anticuerpos primarios o secundarios, pueden ser marcados con radioisótopos (por ejemplo, <sup>125</sup>I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC) o enzimas (por ejemplo, HRP o AP) que catalizan a las reacciones fluorogénicas o luminogénicas.

#### 1. EMIT (Técnica de Ensayos Inmunológicos Multiplicados de Enzimas - Enzyme Multiplied Immunoassay Technique)

[0357] EMIT es un ensayo inmunológico de vinculación competitiva que evita un paso de separación. Es un tipo de ensayo inmunológico en el cual a proteína es marcada con una enzima, y el complejo encima – proteína - anticuerpo es enzimáticamente inactivo, permitiendo la cuantificación de la proteína no marcada.

#### 2. ELISA (Ensayo inmunoabsorbente vinculado con enzimas - Enzyme-linked immunosorbent assay)

[0358] Los métodos para la detección proteínica aquí mencionados, incluyen a ELISA para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. Ensayos inmunoabsorbentes vinculados con enzimas se basan en anticuerpos adheridos a soportes sólidos combinados con reacciones enzimáticas para producir sistemas capaces de detectar niveles bajos proteínicos. También es conocido como un ensayo inmunológico enzimático o EIA. El antígeno, incluyendo, pero sin limitarse a una proteína, es detectado por los anticuerpos que han sido hechos en contra de este; eso es, para el cual es el antígeno. A menudo se usan anticuerpos monoclonales.

[0359] La prueba puede requerir que los anticuerpos sean fijados a una superficie sólida, tal como la superficie interior de un tubo de prueba; y una preparación de los mismos anticuerpos acoplados a una enzima. La enzima es una (por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa) que produce un producto con coloración de un sustrato incoloro. La prueba, por ejemplo, es realizada al llenar el tubo con la solución de antígenos (por ejemplo, proteínas) para el ensayo. Cualquier molécula de antígenos presente puede enlazarse a las moléculas inmovilizadas de anticuerpos. La conjugación anticuerpo - enzima es agregada a la mezcla de reacción. La parte de anticuerpos de la conjugación se enlaza a las moléculas de antígenos que fueron enlazadas previamente, creando un "Emparedado" anticuerpo – antígeno - anticuerpo. Después de lavar y desprender cualquier conjugación no vinculada, la solución sustrato es agregada. Después de un intervalo establecido, la reacción es detenida (por ejemplo, al agregar N NaOH) y la concentración de producto colorado formado por la reacción del sustrato con las moléculas conjugadas con el anticuerpo secundario es medida con espectrofotómetro. La intensidad del color es proporcional a la concentración de antígenos enlazados.

[0360] ELISA también puede ser adaptada para dividir la concentración de anticuerpo, en cuyo caso, los usos son cubiertos con el antígeno apropiado. La solución (por ejemplo, suero) que contiene el anticuerpo es agregada. Después de que haya tenido tiempo para enlazar al antígeno inmovilizado, se agrega una conjugación enzimática

anti inmunoglobulina, que consiste de un anticuerpo en contra de los anticuerpos que se están probando. Después de lavar y desprender a los reactivos que no hayan reaccionado, se agrega el sustrato. La intensidad del color producido es proporcional al monto de anticuerpos marcados con enzimas enlazados (y por lo tanto a la concentración de anticuerpos que están siendo ensayados).

5

### 3. Ensayos Radioinmunológicos

**[0361]** Los métodos para la detección proteínica aquí descritos, incluyen ensayos radioinmunológicos para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. Los ensayos radio inmunológicos son altamente sensibles. Al usar anticuerpos de alta afinidad (por ejemplo,  $K_0 = 10^8\text{-}10^{11} \text{ M}^{-1}$ ), es posible detectar algunos picogramas (10-12 g) de antígenos en el tubo.

10

**[0362]** Isótopos radioactivos pueden ser utilizados para estudiar metabolismos, distribuciones y enlaces in vivo de montos pequeños de compuestos. Los isótopos radiactivos de  $^1\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{S}$ ,  $^{127}\text{I}$  son usados tales como,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{125}\text{I}$ . Isótopos radioactivos tienen casi las mismas propiedades químicas que los que no lo son, por lo que pueden ser convertidos fácilmente. Además debido a que su energía radiactiva es relativamente grande, sólo se necesita un pequeño monto.

15

**[0363] Método de Fijación de Receptores** - Para un formato de plato de 96 pozos, se fijan receptores en cada pozo al usar métodos de anticuerpos o químicos, y ligandos marcados relativamente son agregados a cada pozo para inducir los enlaces. Ligandos no vinculados son lavados y desprendidos y el estándar es determinado por el análisis cuántico de la radio unidad de los ligandos vinculados o aquellos ligandos que fueron lavados y desprendidos. La adición de compuestos objetivos para la examinación induce a reacciones de vinculación competitivas con receptores. Si compuestos objetivos muestran una afinidad más alta a los receptores que los ligandos radiactivos estándar, la mayoría de los ligandos radiactivos no se enlazan a los receptores y esto se quedan en la solución. Por lo tanto, al analizar la cantidad de ligandos radiactivos enlazados (o los ligandos que se lavaron y se desprendieron), la afinidad de los compuestos objetivos con los receptores puede ser indicada fácilmente.

20

25

**[0364]** Un método de membrana de filtro puede ser utilizado cuando los receptores no se pueden fijar a los platos de 96 pozos o la inoculación de ligandos debe realizarse en una fase de solución. Con este método, después de la reacción de vinculación ligando - receptor es realizada en la solución. La solución de reacción es filtrada a través de un papel filtro de nitrocelulosa. Moléculas pequeñas incluyendo ligandos pasarán a través del filtro, y solamente los receptores proteínicos se quedarán. Sólo los ligandos que están fuertemente vinculados a los receptores permanecerán en el papel filtro, y la afinidad relativa de los compuestos agregados podrá ser identificada por medio de un análisis cuantitativo de los ligandos radioactivos estándar. Este método también puede ser utilizado para examinar a los inhibidores de quinasa proteínicos. En este caso,  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  puede ser utilizado como un proveedor del grupo de ácidos fósforos, y al revisar el sustrato proteínico marcado con radiactividad, la actividad enzimática puede ser analizada. El ATP radiactivo que no reacciona será filtrado y removido.

30

35

**[0365]** Solamente en forma de ejemplo, los ensayos radio inmunológicos pueden ser realizados al preparar una mezcla de antígenos radiactivos y anticuerpos en contra de ese antígeno. Los átomos de yodo pueden ser introducidos en residuos de tirosina en una proteína, los isótopos radioactivos  $^{125}\text{I}$  or  $^{131}\text{I}$  son usados a menudo. Montos conocidos de antígenos no marcados ("fríos") pueden ser agregados a las muestras de la mezcla. Éstos compiten por dos lugares de vinculación de los anticuerpos. En concentraciones más grandes de antígenos que no han sido marcados, un monto creciente de antígenos radiactivos es desplazado de las moléculas de anticuerpo. El antígeno vinculado al anticuerpo es separado del antígeno libre en el fluido flotante, y la radiactividad de cada uno es medida. De estos datos, una curva de vinculación estándar puede ser dibujada. Las muestras que van a hacer ensayadas ("las desconocidas") son ejecutadas en paralelo. Después de terminar la tasa de antígenos vinculados a antígenos libres en cada desconocida, las concentraciones de antígenos pueden ser leídas directamente de la curva estándar.

40

45

50

**[0366]** Otros métodos de ensayos radio inmunológicos pueden ser utilizados para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. En forma de ejemplo únicamente, se puede precipitar los complejos antígeno - anticuerpo al agregar un "segundo" anticuerpo dirigido en contra del primero. Por ejemplo, si se está utilizando un IgG de conejo para vincular al antígeno, el complejo puede ser precipitado al agregar un antisuero IgG - anti- conejo (por ejemplo, obtenido al inmunizar a una cabra con el IgG de conejo) alternamente, los anticuerpos específicos del antígeno puede ser acoplados a las paredes internas del tubo de ensayo. Después de la incubación, los contenidos no vinculados son removidos; el tubo es lavado, y la radiactividad del material no vinculado y vinculado es medida. Los anti cuerpos específicos del antígeno pueden ser acoplados a partículas, como la Sephadex. La centrifugación de la mezcla de reacción separa a las cuentas de vinculaciones (en el pellet) de las cuentas sin vinculaciones libres en el fluido flotante.

55

60

### 4. Ensayos Inmunológicos de Fluorescencia

65

- 5 [0367] Los métodos para la detección proteínica aquí descritos, incluyendo ensayos inmunológicos de fluorescencia para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. Los métodos inmunológicos basados en fluorescencia se basan en la vinculación competitiva de ligandos marcados versus ligandos no marcados en lugares de receptores altamente específicos. Es una herramienta muy importante para la bioquímica clínica y analítica en el análisis de proteínas.
- 10 [0368] Esta técnica puede ser utilizada para ensayos inmunológicos que se basan en cambios de fluorescencia durante la vida útil con concentraciones cambiantes de analitos. Esta técnica funciona con colorantes que tienen una vida útil corta como por ejemplo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (el donante) cuya fluorescencia es neutralizada por la transferencia de energía a la Eosina (el aceptador). Varias especies moleculares han sido utilizadas para causar una transferencia de energía desde una molécula donante a una molécula aceptadora. En particular, la formación del complejo inmunológico tipo Emparedado puede ser utilizada con esta técnica.
- 15 [0369] Varios compuestos fotoluminiscentes pueden ser utilizados en el método aquí descrito e incluyen los compuestos ya mencionados en la microscopía fluorescente, así como grupos tales como cianinas, oxazinas, tiazinas, porfirinas, ftalocianinas, hidrocarburos aromáticos polinucleares que emiten fluorescencia infrarroja, ficobiliproteínas, escuarainas y complejos organometálicos, hidrocarburos y colorantes azoicos.
- 20 [0370] Los métodos inmunológicos que se basan en fluorescencia pueden ser, por ejemplo, heterogéneos o homogéneos. Los ensayos inmunológicos heterogéneos comprenden una separación física del enlace de los analitos marcados como enlazados. El analito o anticuerpo puede estar adherido a una superficie sólida. La técnica puede ser competitiva (para una selectividad más alta) o no competitiva (para una sensibilidad más alta) la detección puede ser directa (sólo se utiliza un tipo de anticuerpo) o indirecta (se utiliza un segundo tipo de anticuerpo). Los ensayos inmunológicos homogéneos no comprenden un tipo de separación física. Los antígenos de doble anticuerpo marcados con fluoróforos participan en una reacción de equilibrio con anticuerpos dirigidos en contra del antígeno y del fluoróforo. Los antígenos marcados y no marcados compiten por un número limitado de anticuerpos anti - antígenos.
- 25 [0371] **Método de Marcación Simple de Fluorescencia** - Puede ser utilizado para la vinculación receptor - ligando, para la actividad enzimática al usar la fluorescencia pertinente y como un indicador de fluorescencia de varios cambios fisiológicos in vivo tales como el pH, la concentración iónica y la presión eléctrica. La autofluorescencia de aminoácidos tales como la tirosina y el triptófano resulta en una radiación de fondo, y para superar a aquellos compuestos fluorescentes con puntos débiles de longitud UV de absorción que supera los 520 nm se utiliza a menudo cianina.
- 30 [0372] **FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer): Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia** - FRET puede ser utilizada para medir la interacción de dos proteínas in vivo y puede medir distancias de escala nanométrica y cambios en distancia (conformación). Por lo tanto, ha sido utilizada para medir interacciones simples proteína - proteína y cambios en el plegado, conformación y estabilidad proteínicos (refiérase a Philipps, B.; Hennecke, J.; Glockshuber R. Mol Biol. 2003, 327, 239-249; Riven, I.; Kalmanson, E.; Segev, L.; Reuveny E. Neuron. 2003, 38, 225-235). Dos moléculas fluorescentes diferentes (fluoróforos) se conjugan con dos proteínas de interés. Los polipéptidos de aminoácidos no naturales conjugados a fluoróforos pueden ser utilizados en FRET. Cuando dos compuestos fluorescentes son utilizados en vez de un solo compuesto fluorescente, la transferencia de energía no fluorescente ocurre. Cuando la longitud de onda de emisión de un donante fluorescente es similar a la longitud de onda de absorción de un aceptador, el donante en su estado de excitación transferirá su energía al aceptador y a su vez emitirá una luz fluorescente, y consecuentemente la emisión ocurre con la longitud de onda de emisión del aceptador. Varias parejas diferentes de fluoróforos han sido utilizadas para el análisis FRET incluyendo GFP (proteína fluorescente verde - green fluorescent protein), variantes CFP (ciano) e YFP (amarillo) fusionadas a las proteínas de interés.
- 35 [0373] La distancia  $R_0$  del 50% del efecto FRET depende de la superposición del rango de emisión de los donantes, del rango de absorción de los aceptadores, y las producciones cuánticas del aceptador y del solvente. Si dos moléculas fluorescentes están a una distancia más corta entre sí que  $R_0$ , cuando la luz de absorción del donante es emitida, en teoría, la fluorescencia de la aceptadora será mayor. Si la distancia se vuelve más larga que  $R_0$ , cuando la misma luz es emitida, la fluorescencia del donante será detectada como mayor. Por lo tanto, la actividad enzimática puede ser medida fácilmente si las moléculas fluorescentes son vinculadas a los extremos de polipéptidos pequeños, que pueden ser utilizados como quinasas tales como la proteasa. BRET (transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia - Bioluminescence resonance energy transfer) fue desarrollada por Xu et al (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 1999, 96, 151-156). Actúa en un principio similar a FRET y se basa en el hallazgo que el espectro de emisión de la luciferasa Renilla es similar a aquel de CFP. Estas técnicas permiten el estudio de interacciones dentro de los compartimientos subcelulares específicos, incluyendo técnicas proteína - proteína de membranas, cuando se utilizan las variantes de técnicas fluorescentes dirigidas a orgánulos. Además eventos de modificación post - traducción pueden ser estudiados en células de mamíferos.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

**[0374] TRF: Fluorescencia Resuelta por Tiempo (Time Resolved Fluorescence)-** Para reducir el fondo fluorescente, se desarrolló la fluorescencia resuelta por tiempo. La vida útil de estados de excitación de moléculas fluorescentes comunes es usualmente de sólo unos pocos microsegundos, pero los elementos de las series de lantánidos tienen vidas útiles de milisegundos. TRF es un método que mide selectivamente la fluorescencia de las series de lantánidos después de que ha terminado la emisión de otras moléculas fluorescentes. Los TRF junto con FRET y series de lantánidos se vuelven donantes y aceptadores.

## 5. Varios formatos de ensayos

**[0375]** Varios formatos de ensayos pueden ser utilizados para la detección de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos, aquí descritos, incluyendo ensayos inmunológicos "Emparedado" y ensayos de sondas. Por ejemplo, en un primer formato de ensayos, un anticuerpo policlónico o monoclonal o sus fragmentos, o una combinación de estos anticuerpos, que ha sido cubierta en una fase sólida, es contactada con una muestra de prueba, para formar una primera mezcla. Esta primera mezcla es incubada durante un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para formar complejos antígenos / anticuerpos. Entonces, un reactivo indicador que comprende un anticuerpo monoclonal o policlónico o su fragmento, o una combinación de estos anticuerpos, a los cuales un compuesto que genera una señal sea adherido, es contactado con los complejos antígenos / anticuerpos para formar una segunda mezcla. La segunda mezcla es incubada durante un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para formar complejos anticuerpos / antígenos / anticuerpos. La presencia de los antígenos en la muestra de prueba y aquellos capturados en la fase sólida, si existiesen, se determinan al detectar la señal medible generada por el compuesto generador de señales. El monto de antígenos presentes en la muestra de prueba es proporcional a la señal generada.

**[0376]** En un formato de ensayo alterno, una mezcla es formada al contactar: (1) un anticuerpo policlónico, un anticuerpo monoclonal o su fragmento, que vincula específicamente al antígeno, o una combinación de aquellos anticuerpos enlazados a un soporte sólido; (2) la muestra de prueba; y (3) un reactivo indicador que comprende un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlónico o uno de sus fragmentos, que se vincula específicamente a un epítipo diferente (o una combinación de estos anticuerpos) al cual un compuesto generador de señales es adherido. Esta mezcla es incubada durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar complejos anticuerpo / antígeno / anticuerpo. La presencia, si la hubiese, de antígenos presentes en la muestra de prueba y capturados en la fase sólida es determinada al detectar la señal medible generada por el compuesto generador de señales. El monto de antígenos presentes en la muestra de prueba es proporcional a la señal generada.

**[0377]** En otro formato de ensayos, una combinación de por lo menos 2 anticuerpos monoclonales del invento pueden ser utilizados como una sonda competitiva para la detección de anticuerpos de un antígeno. Por ejemplo, los polipéptidos de aminoácidos no naturales aquí descritos, ya sea solos o en combinación, son cubiertos en una fase sólida. Una muestra de prueba que se cosecha contiene anticuerpos del antígeno y es incubada entonces con un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señales y por lo menos un anticuerpo monoclonal durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar complejos antígenos / anticuerpos de la muestra de prueba y del reactivo indicador vinculados a la fase sólida o el reactivo indicador vinculado a la fase sólida. La reducción en la vinculación del anticuerpo monoclonal a la fase sólida puede ser medido cuantitativamente.

**[0378]** En otro método de detección, los anticuerpos monoclonales o policlónicos pueden ser utilizados para la detección de antígenos en secciones de tejidos, así como en células, por medio de análisis inmunohistoquímico. Las secciones de tejidos pueden ser cortadas de muestras fijadas congeladas o por medios químicos del tejido. Si los antígenos deben ser detectados en las células, las células pueden ser aisladas de la sangre, orina, aspirados de mama u otros fluidos corporales. Las células pueden ser obtenidas por medio de biopsias, ya sea quirúrgica o con agujas. Las células pueden ser aisladas por medio de centrifugación o atracción magnética después de marcarlas con partículas magnéticas de fluidos férricos para enriquecer una fracción de las partículas de células para triturarlas con anticuerpos. El análisis citoquímico donde estos anticuerpos son marcados directamente (con, por ejemplo, fluoresceína, oro coloidal, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etcétera) o marcadas utilizando anticuerpos anti - especies marcados secundarios (con varias marcaciones tal como se usa como ejemplo en este documento) para rastrear la histopatología de la enfermedad también se encuentra dentro del alcance de este invento.

**[0379]** Las combinaciones de anticuerpos monoclonales (y sus fragmentos) también pueden ser utilizadas juntas como componentes en una mezcla o "cóctel". Con anticuerpos que se enlazan específicamente de otras regiones de los polipéptidos de aminoácidos no naturales aquí descritos, donde cada anticuerpo tiene diferentes especificidades de enlace. Los anticuerpos policlónicos utilizados en los ensayos pueden ser utilizados solos o como un cóctel de anticuerpos policlónicos. Puesto que los cócteles utilizados en los formatos de ensayos comprenden a anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlónicos que tienen diferentes especificidades de vinculación a los polipéptidos de aminoácidos no naturales aquí descritos. Estos son útiles para detectar, diagnosticar, hacer ensayos, monitorear, pronosticar, tomar imágenes in vivo, prevenir o tratar, o determinar la predisposición a varias enfermedades y condiciones.

5 [0380] Se contempla que los aminoácidos no naturales aquí descritos, pueden ser detectados en ensayos al usar un antígeno recombinante así como al usar un polipéptido sintético o polipéptido purificado, polipéptido que, tiene una secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de aminoácidos no naturales aquí descritos. También se contenta la que polipéptidos sintéticos, recombinantes o purificados de interés, que identifican a diferentes epítopes de los polipéptidos de aminoácidos no naturales aquí descritos, pueden ser utilizados en combinación con un ensayo para la detección, el diagnóstico, la elaboración de ensayos, el monitoreo, el pronóstico, la toma de imágenes in vivo, etcétera. En este caso, todos estos polipéptidos pueden ser cubiertos en una fase sólida; cada polipéptido separado puede ser cubierto en fases sólidas separadas, tales como micropartículas, y entonces pueden ser combinados para formar una mezcla de polipéptidos que pueden ser utilizadas después en ensayos. Los polipéptidos cubiertos en fases sólidas o marcados con marcadores detectables se les permite, competir con aquellos presentes en una muestra para un monto limitado de anticuerpos. Una reducción en el enlace de los péptidos sintéticos, recombinantes o purificados al anticuerpo (o anticuerpos) es una indicación de la presencia de los polipéptidos de aminoácidos no naturales aquí descritos. Variaciones de los formatos de ensayos son conocidos a aquellas personas con un conocimiento normal en la industria.

#### 6. Microscopio de sonda de detección (SPM - Scanning probe microscopy) para ensayos inmunológicos

20 [0381] Los métodos para la detección proteínica aquí descritos incluyen a SPM para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. En el método de microscopio de sondas de detección, en la fase de captura, por ejemplo, por lo menos uno de los anticuerpos monoclonales es adherido a una fase sólida y un microscopio de sondas de detección es utilizado para detectar complejos antígenos / anticuerpos que pueden estar presentes en la superficie de la fase sólida. La utilización de un microscopio de efecto túnel elimina la necesidad de marcaciones que normalmente deben ser utilizadas en muchos sistemas de ensayos inmunológicos para detectar complejos anticuerpos / antígenos.

30 [0382] El uso de SPM para monitorear reacciones de vinculaciones específicas puede ocurrir en muchas formas. En una instancia, un miembro de un compañero de vinculación específico (una sustancia específica de analitos que es el anticuerpo monoclonal) se adhieren a una superficie adecuada para la detección. La adherencia de la sustancia específica de analitos puede ser por medio de adsorción a una pieza de prueba que comprende una fase sólida de una superficie plástica o metal. Podría utilizarse la adherencia covalente de compañero de enlace específico (sustancia específica de analitos) a una pieza de prueba que comprende una fase sólida de algún derivado del plástico, metal, silicona o vidrio. Métodos de adherencia covalente son conocidos para aquellas personas en la industria e incluyen una variedad de medios para enlazar irreversiblemente a compañeros de vinculación específicos a esta pieza de prueba. Si la pieza de prueba es silicona o vidrio, la superficie debe ser activada antes de adherir al compañero de vinculación específico. También, las interacciones de polielectrolitos pueden ser utilizadas para inmovilizar a un compañero de vinculación específico a una superficie de la pieza de prueba usando técnicas y químicas. El método preferido de adherencia es por medios covalentes después de la adherencia de un miembro de vinculación específico, la superficie puede ser tratada además con materiales tales como sueros, proteínas u otros agentes bloqueadores para minimizar la vinculación no específica. Las superficies también pueden ser examinadas en las instalaciones de fabricación o en el punto de uso para verificar su idoneidad para los propósitos del ensayo. No se anticipa que el proceso de detección altere las propiedades de adherencia específicas de la pieza de prueba.

#### 45 C. Espectroscopia

##### 1. Resonancia magnética nuclear (NMR - Nuclear magnetic resonance)

50 [0383] Los métodos para la detección proteínica aquí descritos incluyen a NMR para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos.

55 [0384] La espectroscopia NMR es capaz de determinar las estructuras de macromoléculas biológicas similares a las proteínas y ácidos nucleicos con una resolución óptica. Adicionalmente, es posible estudiar fenómenos dependientes del tiempo con NMR, tales como dinámicas intramoleculares en macromoléculas, cinética de reacciones, reconocimiento molecular o doblaje proteínico. Métodos para la detección proteínica aquí descritos incluyen a NMR para detectar polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos.

60 [0385] Progreso en las capacidades teóricas y prácticas de NMR, han conllevado a la utilización eficiente cada vez más común del contenido de información de espectros NMR. Desarrollos paralelos en los métodos bioquímicos (expresión proteínica recombinante) permiten una preparación simple y rápida de muestras proteínicas. Heteronúcleos tales como  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^2\text{H}$ , pueden incorporarse en proteínas por medio de marcaciones isotópicas uniformes o selectivas. El espectro de estas muestras puede ser simplificado drásticamente. Adicionalmente, alguna información nueva acerca de la estructura y dinámica de las macromoléculas puede determinarse con estos



métodos. Todos estos desarrollos permiten actualmente la determinación estructural de proteínas con una masa de hasta 30 KDa o más.

## 2. Cristalografía de rayos X

5 **[0386]** Métodos para la detección proteínica tal como se describe aquí, incluyen cristalografía de rayos X para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos.

10 **[0387]** La cristalografía de rayos X es una técnica de cristalografía en la cual el patrón producido por la difracción de rayos equis a través del enrejado espaciado estrechamente de átomos en un cristal es grabado y entonces analizado para revelar la naturaleza de ese enrejado. Esto generalmente conlleva a una comprensión del material y de la estructura molecular de una sustancia. Los espacios en el enrejado de cristal pueden ser determinados utilizando la ley de Bragg. Los electrones que rodean a los átomos, en vez de a los núcleos atómicos en sí, son las entidades que interactúan físicamente con los protones de rayos X que ingresan. Esta técnica es utilizada ampliamente en la química y la bioquímica para determinar las estructuras de una variedad inmensa de moléculas, incluyendo compuestos inorgánicos, ADN y proteínas. La difracción de rayos X es ejecutada comúnmente utilizando cristales simples de un material, pero si éstos no están disponibles, muestras microcristalinas en polvo pueden ser utilizadas, aunque esto requiere diferentes equipos y es mucho menos simple.

20 **[0388]** Para la cristalografía de rayos X, la molécula deben ser cristalizada. Un fotón difractado por un electrón no puede ser detectado confiablemente, sin embargo, dada la estructura cristalina regular; los fotones son difractados por los electrones correspondientes en muchas moléculas formadas simétricamente. Puesto que las ondas de la misma frecuencia cuyos picos cuadran y se refuerzan entre sí, la señal se vuelve detectable. Para determinar una estructura, los cristales de la molécula de interés son cultivados utilizando algún método de cristalización. Los cristales son cultivados y a menudo son congelados con nitrógeno líquido. Los cristales congelantes reducen el daño por radiación incurrida durante la recaudación de datos y reducen la moción térmica dentro de los cristales. Los cristales son colocados en un difractor, una máquina que emite un destello de rayos X. Los rayos X difractan a los electrones en el cristal, y el patrón de difracción es grabado y escaneado en una computadora. Estas imágenes de difracción son combinadas y eventualmente utilizadas para construir un mapa de la densidad de electrones de la molécula que fue cristalizada, los átomos son calzados al mapa de densidad de los electrones y varios parámetros tales como la posición son recibidos para que cuadre de una forma óptima a los datos de difracción observada.

## 3. Espectroscopia de fluorescencia

35 **[0389]** Los métodos para detección proteínica aquí descritos, incluyen a la espectroscopia de fluorescencia para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos.

40 **[0390]** Aparte de las medidas de fluorescencia estándar una variedad de otros métodos han sido desarrollados. La fluorometría convencional involucra la toma de medidas de emisión de intensidades luminosas en longitudes de onda definidas para una emisión máxima cierta de fluoróforos. La fluorometría comprende una recaudación de datos para un continuum de absorción así como de longitudes de onda de emisión. En la polarización de fluorescencia, una luz polarizada es utilizada para la excitación y vinculación de antígenos marcados con fluorocromo a anticuerpos específicos que afectan la magnitud de la polarización. La espectroscopia de estrechamiento de línea comprende una espectroscopia del estado sólido a bajas temperaturas que deriva su selectividad del espectro de emisión de línea estrecha que suministra.

50 **[0391]** La espectroscopia de fluorescencia que depende del tiempo comprende las mediciones resueltas durante el tiempo que contienen más información que las medidas en un estado estacionario, puesto que los valores en un estado estacionario representan el promedio de tiempo de las determinaciones resueltas al pasar del tiempo. Es una técnica de sincronización de fotones en la cual se mide el tiempo entre un pulso de luz de excitación y el primer fotón emitido por la muestra.

55 **[0392]** La espectroscopia de fluorescencia de frecuencia de dominios es una alternativa para los métodos resueltos por tiempo. El decaimiento del tiempo de fluorescencia es medido típicamente utilizando una fuente luminosa con una intensidad modulada sinusoidalmente a una frecuencia dada, al determinar el retraso de la fase y la modulación relativa de la señal de fluorescencia con respecto a la luz de la excitación.

60 **4. Espectroscopia de la Masa y del tiempo de fuga de la Ionización de Desorción / Ionización Láser asistida por matrices (MALDI TOF-MS - Matrix Assisted Laser Desorption ionization time-of-flight mass spectrometry)**

**[0393]** Los métodos para la detección proteínica aquí presentados, incluyen a MALDI TOF-MS para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fracciones.

5 **[0394] TOF-MS linear** - La espectrometría de masa ha emergido como una herramienta importante para analizar y caracterizar moléculas grandes de varias complejidades. La técnica de desorción / ionización láser asistida por matrices (MALDI), desarrollada en 1987, ha incrementado el límite de masa superior para los análisis de espectroscopia de masa de biomoléculas que superan los 300,000 Da y ha hecho posible el análisis de biomoléculas grandes por medio de espectrometría de masa para que esta se vuelva más fácil y más sensible. Los espectrómetros de masa TOF operan bajo el principio de que cuando un grupo bien definido temporalmente y espacialmente de iones de diferentes tasas de masas / cargas ( $m/z$ ) son expuestos al mismo campo eléctrico aplicado ( $K.E. = [mv^2]/2 = zeEs$  donde  $K.E.$  = Energía cinética (kinetic energy);  $m$  = la masa del ion;  $v$  = la velocidad del ion;  $z$  = el número de cargas;  $e$  = la carga de un electrón en colombos;  $E$  = el gradiente del campo eléctrico; y  $s$  = la distancia de la región de la fuente iónica) y se le permite desplazarse en una región de un campo eléctrico constante, atravesarán esta región en un tiempo que depende de sus tasas  $m/z$ .

10 **[0395] Reflectrón TOF-MS** - La resolución de masa mejorada en MALDI TOF-MS ha sido obtenida por la utilización de un reflectrón de una sola fase o de fase doble (RETOF-MS). El reflectrón, ubicado al final del tubo de fuga, es utilizado para compensar por la diferencia en tiempos de fuga de los mismos iones  $m/z$  de energías cinéticas ligeramente diferentes por medio de un reflector de iones. Esto resulta en un enfoque de los paquetes de iones en el espacio y tiempo en el detector. En el espectro de masa del reflectrón, isotópico multiplete es bien resuelto produciendo una resolución de masa máxima de la mitad de ancho completo (FWHM - full width half maximum) de alrededor de 3400. Las resoluciones de masa de hasta 6000 (FWHM) han sido obtenidas para péptidos de hasta 3000 Da con RETOF-MS. El mejorar la resolución de masa también ha incrementado la precisión de masa cuando se determina la masa de los iones.

20 **[0396]** Históricamente, los MALDI-TOF-MS lineares y de reflectrones han sido utilizados principalmente para determinaciones de masa molecular de iones moleculares y compendios enzimáticos que conllevan a la información estructural de las proteínas. Estos compendios son analizados típicamente en lo que se refiere a su masa con o sin purificadores de determinaciones de masa molecular. Variedades de metodologías han sido desarrolladas para obtener información secuencial primaria para proteínas y péptidos utilizando MALDI TOF-MS. Dos métodos diferentes han sido tomados. El primer método es conocido como una secuenciación de escalera proteínica y es utilizado para producir fragmentos informativos estructurales del analito antes de su inserción al espectrómetro de masa TOF y su análisis subsiguiente. El segundo método utiliza el fenómeno de decaimiento iónico metaestable que ocurre adentro del espectrómetro de masa TOF para producir información secuencial.

30 **[0397] Secuenciación de escalera con TOF-MS** - Las proteínas o péptidos pueden ser secuenciados utilizando MALDI -TOF-MS con una técnica de secuenciación de escalera que consiste en una degradación química que depende del tiempo o que depende de la concentración del terminal N- o C- de la proteína o péptido a fragmentos, cada uno diferente por un residuo de aminoácidos. La masa de la mezcla es analizada en un solo experimento MALDI -TOF-MS con las diferencias de masa entre picos espectrales de masa adyacentes que corresponden a un residuo de aminoácidos específico. Este tipo de análisis puede ser considerado como simplemente la determinación de masas de una serie de péptidos / proteínas que están presentes en una sola muestra MALDI. El orden de ocurrencia en el espectro de masa define la secuencia de los aminoácidos en la proteína o péptido original.

40 **[0398] El Decaimiento Post - Fuente con RETOF-MS MALDI** - se ha considerado históricamente una técnica de ionización "suave" que produce casi exclusivamente especies iónicas pseudomoleculares protonadas intactas. Un nivel significativo de decaimiento iónico metaestable de péptidos y proteínas incluye típicamente pérdidas de moléculas neutras (tales como agua, amoníaco y porciones de las cadenas laterales de aminoácidos) y divisiones aleatorias de los enlaces de los péptidos. La construcción de estos productos de decaimiento iónico estable en el espectro de masa MALDI depende de la configuración instrumental TOF.

45 **[0399]** MALDI TOF-MS se ha vuelto una herramienta valiosa en las biociencias para obtener determinaciones precisas de masa de información secuencial primaria. Los métodos para la detección proteínica aquí descritos incluyen a MALDI TOF-MS para detectar polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. La información secuencial obtenida del espectro de masa cuya secuencia fue conocida anteriormente no significa de ninguna manera un esquema simple para deducir una secuencia desconocida de péptido o proteína a partir del espectro de masa de decaimiento iónico estable. Estas técnicas MALDI se las considera como las más útiles en conjunto con las técnicas bioquímicas convencionales tales como los compendios proteínicos. Pueden ser aplicables para identificar terminales de aminos bloqueados, modificaciones post - traducción y lugares de mutaciones en proteínas conocidas en esta forma. También, con un desconocimiento total, un monto significativo de determinación estructural preliminar debería ser posible en montos muy pequeños (menores a 10 pmoles) de analitos. Para la secuenciación de escalera y estudios de fragmentación de fuentes internas, es importante el minimizar las impurezas potenciales de los péptidos.

65

**[0400] Decaimiento en la fuente con TOF-MS Linear** - un método alternativo a RETOF - MS para estudiar el decaimiento iónico estable de los iones generados por MALDI es el utilizar el DE con TOF - MS linear. Al utilizar la técnica DE, la información estructural primaria de péptidos y proteínas también puede ser obtenida. La fragmentación iónica oportuna producida en el momento del evento de desorción (es decir, la formación iónica) es generalmente ausente para el péptido generado por MALDI o los iones proteínicos. Al incorporar un retraso de tiempo entre la formación iónica y la extracción iónica, se les permite a los iones en la fuente fragmentarse en un período de tiempo relativamente corto (<100 ns) a iones y neutrales más pequeños antes de la extracción. Un potencial de extracción es aplicado al sacar los iones fragmentados. Picos coherentes espectrales de masa son producidos de estos iones decaídos metaestables dando lugar a información estructural significativa para péptidos y proteínas.

#### 5. Tiempo de fuga de la - Ionización de desorción láser superficial mejorada - (SELDI-TOF - Surface-enhanced laser desorption ionization)

**[0401]** otra tecnología proteómica involucrada en el análisis cuantitativo de las mezclas proteínicas es conocido como el Tiempo de fuga de la - Ionización de desorción láser superficial mejorada - (SELDI-TOF - Surface-enhanced laser desorption ionization). Los métodos para la detección proteínica aquí descritos, incluyen a SELDI-TOF para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos.

**[0402]** Esta técnica utiliza soportes de acero inoxidable o aluminio o chips diseñados con superficies señuelo químicas (hidrofílicas, hidrofóbicas, pre - activadas, de fase normal, de afinidad metálica inmovilizada, catiónicas o aniónicas) o biológicas (anticuerpos, fragmentos que se enlazan con antígenos (incluyendo, pero sin limitarse a, scFv), ADN, enzimas o receptores) con un diámetro de 1 - 2 mm. Estas superficies químicas y bioquímicas variadas permiten una captura diferencial de proteínas que se basa en las propiedades intrínsecas de las mismas proteínas. El tejido o los fluidos corporales solubilizados en volúmenes tan pequeños como 0.11 gramos son aplicados directamente a estas superficies, donde las proteínas con afinidades a la superficie señuelo se adherirán. Es desde una serie de lavados para remover las proteínas que no se adhirieron específicamente o que se adhirieron de una forma débil, las proteínas adheridas son desorbidas y ionizadas para el análisis MS. Masas de proteínas que varían desde péptidos pequeños de menos de 1000 Da hasta proteínas que superan los 300 kDa son calculadas basándose en el tiempo de fuga. Puesto que las mezclas de proteínas serán analizadas dentro de diferentes muestras, una huella o firma muestra única resultará de cada muestra probada. Consecuentemente, los patrones de las masas son producidas por el análisis SELDI desde identificaciones proteínicas reales. Estos patrones espectrales de masa son utilizados para diferenciar a las muestras de pacientes entre sí, entre enfermos y normales aunque las huellas proteínicas podrán ser analizadas para expresiones de biomarcaciones diferenciales, esta tecnología en la actualidad no puede identificar específicamente proteínas dentro de una muestra utilizando MS. Sin embargo, esta situación está evolucionando rápidamente puesto que prototipos están siendo probados los cuales acoplan la tecnología SELDI-TOF con espectrómetros de masa tándem. El acoplamiento de estos tipos de instrumentos permitirán la secuenciación de aminoácidos y su identificación proteínica subsiguiente.

#### 6. UV VIs

**[0403]** Los métodos para detección proteínica aquí descritos incluyen a UV-VIs para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos.

**[0404]** La espectroscopia de absorción óptica (UV-VIs) juega un rol importante para la determinación de concentraciones (proteínas, ADN, nucleótidos, etcétera). Los colorantes orgánicos pueden ser utilizados para mejorar la absorción y para transformarla en un rango visible (por ejemplo, reactivos azules coomassie) entendiendo las fuerzas que gobiernan la interacción de las proteínas entre sí para ayuda entender a aquellos procesos de ensamblaje macromolecular, doblaje proteínico asistido por chaperones y translocación proteínica.

**[0405]** La Espectroscopia de Resonancia Raman (RRS - Resonance Raman Spectroscopy) es una herramienta que puede ser utilizada para estudiar la estructura y dinámica molecular. El dispersamiento de resonancia Raman requiere un proceso de excitación dentro de una banda de absorción electrónica y resulta en un incremento grande de dispersión. Pocas moléculas tienen bandas de absorción visible; sin embargo todo absorbe en la profundidad UV. Al usar luz UV es posible estudiar una amplia variedad de cromóforos incoloros, y tener el beneficio adicional de evitar interferencia de la fluorescencia. Además, electrones de grupos funcionales diferentes con longitudes de onda de excitación diferentes pueden ser excitados selectivamente. Este método ayuda a investigar partes específicas de macromoléculas al utilizar diferentes longitudes de onda de excitación.

#### 7. Cromatografía Líquida (LC - Liquid Chromatography)

- 5 [0406] La cromatografía líquida ha sido una herramienta poderosa para aislar proteínas, péptidos y otras moléculas de mezclas complejas. Los métodos para detección proteínica aquí descritos incluyen a LC para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. La cromatografía líquida puede ser una cromatografía de afinidad, una cromatografía de filtración de gel, una cromatografía de intercambio de aniones, una cromatografía de intercambio de cationes, LC de grupos de diodos y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC - high performance liquid chromatography).
- 10 [0407] La cromatografía de filtración de gel separa a proteínas, péptidos y oligonucleótidos en base a su tamaño. Las moléculas se mueven a través de una cama de esferas porosas, difundiéndose en las esferas en mayores o menores grados. Las moléculas más pequeñas se difunden en mayor forma en los poros de las esferas y por lo tanto se mueven a través de la cama en una forma más lenta, mientras que las moléculas más grandes entran menos o no logran hacerlo y por lo tanto se mueven a través de la cama más rápidamente. La masa molecular y la forma tridimensional contribuyen con el grado de retención. La cromatografía de filtración de gel puede ser utilizada para el análisis de tamaño molecular, para separaciones de los componentes en una mezcla, o para la remoción salina o intercambio de amortiguadores de una preparación de macromoléculas.
- 15 [0408] La cromatografía de afinidad es un proceso de absorción bioselectiva y recuperación subsiguiente de un compuesto a partir de un ligando inmovilizado. Este proceso permite una purificación altamente específica y eficiente de muchas proteínas diversas y de otros compuestos. El proceso requiere la utilización de un ligando selectivo apropiado que vinculará al compuesto deseado generalmente con una constante de disociación en el rango de  $10^4$  -  $10^{-8}$ , permitiendo la recuperación bajo condiciones moderadas. El ligando es, generalmente, inmovilizado en una matriz de esferas y foros que puede estar en la forma de un empaque de columnas o un medio de absorción en forma de lotes.
- 20 [0409] La cromatografía de intercambio iónico separa a las moléculas basándose en las diferencias entre la carga general de las proteínas. Es usada usualmente para purificación proteínica pero puede ser utilizado para la purificación de oligonucleótidos, péptidos u otras moléculas cargadas. La proteína de interés debe tener una carga opuesta que la del grupo funcional adherido a la resina para que pueda vincularse. Por ejemplo, las inmunoglobulinas, que generalmente tienen una carga positiva general, se adherirán bien a intercambiadores de cationes, que contienen grupos funcionales cargados negativamente. Puesto que esta interacción es iónica, la vinculación debe ocurrir bajo condiciones iónicas bajas. La elución se logra al incrementar la fuerza iónica para ver la interacción iónica, o cargando el pH de la proteína.
- 25 [0410] El HPLC puede ser utilizado en la separación, purificación y detección de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos aquí descritos. **Péptidos:** El uso de la cromatografía de fases reversadas (RPC - reversed-phased chromatography) se ha vuelto un paso común e importante en la producción de péptidos sintéticos. La RPC también ha sido utilizada para purificar secuencias naturales. Aunque columnas analíticas son utilizadas para ejecutar el proceso, el procedimiento puede tener una naturaleza preparativa debido al monto limitado de proteínas "activas" en el tejido. Algunas ventajas adicionales son la recuperación de la actividad biológica después de la purificación y la formación de estructuras secundarias o terciarias después de su exposición al RPC son preferidas debido al tamaño abreviado de los péptidos. Extractos de tejidos crudos pueden ser cargados directamente en el sistema RPC y movilizados por medio de elución gradiente. La recromatografía bajo las condiciones idénticas es una opción si más purificación es justificada o necesaria. La RPC también puede ser utilizada en el proceso de determinación estructural proteínica. El procedimiento normal de este proceso es 1) la fragmentación por medio de proteólisis o división química; 2) purificación; y 3) secuenciación. Una fase móvil como para la RPC de péptidos es un gradiente de 0.1 por ciento de ácido trifluoroacético (TFA - trifluoroacetic acid) en agua a 0.1 por ciento de TFA en un solvente orgánico, tal como acetonitrilo, puesto que el solvente orgánico 1) solubiliza el péptido, 2) permite la detección a aproximadamente 230-240 nm, y 3) puede evaporarse de la muestra. **Proteínas Biológicamente Activas:** La utilización de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC - size-exclusion chromatography) y la cromatografía de intercambio iónico (IEC - ion-exchange chromatography) es una buena práctica para su utilización con proteínas biológicamente activas, tales como enzimas, hormonas y anticuerpos puesto que cada proteína tiene su propia estructura única y las técnicas pueden ser realizadas en condiciones fisiológicas. Una recuperación completa de actividades después de su exposición a la cromatografía puede lograrse y actualmente, la disponibilidad de columnas SEC es lo suficientemente diversa para permitir un fraccionamiento desde 10 a 1000 kilodaltons. Proteínas extremadamente básicas o hidrofóbicas puede que no exhiban el carácter SEC verdadero puesto que las columnas tienden a tener un carácter de hidrofobicidad y aiónico ligero. El uso de una elución gradiente con la columna IEC es favorable por la resolución equivalente de cómo la electroforesis de gel de poliacrilamida (PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis) y la capacidad incrementada de carga cuando se la compara con SEC. En la interacción de cromatografía de afinidad líquida (LAC - liquid affinity chromatography) se basa en la vinculación de la proteína debido al mimetismo del sustrato, del receptor, etcétera. La proteína es eluida al introducir un reactivo vinculante competitivo o alterando la configuración proteínica lo cual facilita la disociación. **Proteínas de Membranas:** Las proteínas de membranas son periféricas (ubicadas en la superficie exterior) o integrales (extendidas parcialmente, extendidas completamente o colocadas completamente dentro de la membrana). La lipofilia de la bicapa transmite el carácter lipofílico (es decir, aminoácidos hidrofóbicos) de las proteínas dentro de la membrana. La RPC sería una
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

opción lógica en el análisis y purificación de estas proteínas, pero IEC también es utilizada. Otro procedimiento utilizado en la separación de las proteínas de las membranas es la utilización de detergentes no iónicos, tales como Tritón X-100 o proteínas de solubilización por medio de solventes orgánicos con IEC. El HPLC puede ser acoplado con MS.

5 [0411] La cromatografía líquida de detectores de agrupaciones con diodos (DAD – LC - Diode array detector-liquid chromatography) suministra un espectro completo y múltiple para cada pico HPLC, que, comparativamente, puede suministrar indicaciones de una pureza del pico. Estos datos también pueden asignar la presencia de Tyr, Trp, Phe y la posibilidad de otras (His, Met, Cys) y puede cuantificar estos aminoácidos por medio del análisis del segundo derivado o multicomponente. Por medio de una derivación post - columna, DAD-LC también puede identificar y cuantificar Cys, His y Arg en péptidos individuales. Por lo tanto, es posible analizar a 6 de 20 de aminoácidos de cada péptidos separado en una corrida LC individual, y la información puede ser obtenida acerca de la presencia o ausencia de estos aminoácidos en un péptido en un solo paso. Esto es ayudado por el conocimiento del número de residuos en cada péptido. Además, por medio de la corrección con una absorción de 205 nm para cromóforos de la cadena lateral, esta técnica puede dar una estimación mucho mejor de los montos relativos de cada péptido.

#### D. Electroforesis

20 [0412] Los métodos para la detección proteínica aquí descritos, incluyendo a electroforesis para detectar aminoácidos no naturales, polipéptido de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmento. La electroforesis puede ser electroforesis de gel o electroforesis capilar.

25 [0413] **Electroforesis en Gel:** La electroforesis de gel es una técnica que puede ser utilizada para la separación de proteínas. La separación de moléculas grandes (macro) depende de dos fuerzas: carga y masa. Cuando una muestra biológica, tal como proteínas, es mezclada en una solución de amortiguamiento y se la aplica a un gel, estas dos fuerzas actúan juntas. La corriente eléctrica de un electrodo repele las moléculas mientras el otro electrodo atrae unitariamente a las moléculas. La fuerza ficcional del material del gel actúa como un “filtro molecular”, separando las moléculas de acuerdo a su tamaño. Durante la electroforesis, las macromoléculas son forzadas a moverse a través de los poros cuando la corriente eléctrica es aplicada. Su tasa de migración a través del campo eléctrico depende de la fuerza del campo, del tamaño y forma de las moléculas, la hidrofobicidad relativa de las muestras, y la fuerza iónica y la temperatura del amortiguador en el cual las moléculas se están moviendo. Después de la coloración, las macromoléculas separadas en cada fila pueden ser vistas en una serie de bandas que se dispersan desde un extremo del gel hasta el otro. Utilizando esta tecnología es posible el separar e identificar las moléculas proteínicas que difieren en hasta tan bajo como un aminoácido. Es una ventaja que las proteínas pueden ser visualizadas así como separadas, permitiendo a un investigador el estimar rápidamente el número de proteínas en una mezcla o el nivel de pureza de una preparación proteínica particular. Además, la electroforesis de gel permite la determinación de propiedades cruciales de una proteína tales como su punto isoeléctrico y su masa molecular aproximada.

40 [0414] Electro enfoque, o enfoque isoeléctrico, es una técnica para separar diferentes moléculas por medio de diferencias en su carga eléctrica (si es que éstas tienen alguna carga). Es usada más comúnmente en proteínas. Es un tipo de electroforesis zonal que aprovecha el hecho de que una carga de una molécula cambia en la medida en que cambia el pH de sus alrededores. Las moléculas son distribuidas sobre un medio que tiene un pH gradiente (usualmente creado por medio de anfólitos alifáticos). Se pasa una corriente eléctrica a través del medio, creando un extremo “positivo” y otro “negativo”. Las partículas cargadas negativamente migran a través del pH gradiente hacia el extremo “positivo” mientras que las partículas cargadas positivamente se mueven hacia el extremo “negativo”. Mientras una partícula se mueve a un pH que neutraliza su carga, la corriente parará de fluir. Las partículas de la misma carga inicial se depositarán (o se enfocarán) alrededor del mismo lugar en el pH gradiente.

50 [0415] **Electroforesis Capilar:** La electroforesis capilar es una colección de un rango de técnicas de separación que involucran la aplicación de altos voltajes a lo largo de capilares llenos de un amortiguador para lograr separaciones. Las variaciones incluyen la separación basada en diferencias de tamaño y carga entre los analitos (denominada electroforesis zonal capilar, CZE - Capillary Zone Electrophoresis, o CE de solución libre, FSCE - Free Solution CE), la separación de compuestos neutrales utilizando micelas surfactantes (cromatografía capilar electrocinética micelar, MECC - Micellar electrokinetic capillary chromatography a veces denominada MEKC) filtrando los solutos a través de la red de gel (electroforesis de gel capilar, GCE - Capillary Gel Electrophoresis), la separación de cationes (o aniones) basándose en su movilidad electroforética (isotacoforesis capilar, CITP - Capillary Isotachopheresis), y la separación de solutos zwitteriónicos dentro de un pH gradiente (Enfoque Isoeléctrico Capilar, CIEF - Capillary Isoelectric Focusing). La electrocromatografía capilar (CEC - Capillary electrochromatography) es una técnica de separación electrocinética asociada que involucra aplicar voltajes a lo largo de capilares llenos de fases estacionarias de gel de sílice. La selectividad de separación en CEC es una combinación de procesos electroforético y cromatográficos. Muchas de las ventajas de separación CE se basan en la presencia de un flujo inducido eléctricamente de solución (flujo electro osmótico, EOF - electroosmotic flow) dentro del capilar para bombear solutos hacia el detector. GCE y CIEF son de importancia para la separación de moléculas tales como las

proteínas. Generalmente la CE es realizada usando electrolitos que se basa en sustancias cosas, sin embargo, existe un uso creciente de solventes no acuosos en la CE.

5 [0416] La operación de un sistema CE involucra la aplicación de un voltaje alto (típicamente entre 10 - 30 kV) a lo largo de una sonda (25 - 100 mm) capilar. El capilar es llenado con una solución de electrolitos que conduce la corriente a través del interior del capilar. Los extremos del capilar son sumergidos en reservorios llenos con electrolitos. Los electrodos hechos de un material inerte tal como el platino también son insertados en los reservorios de electrolitos para completar el circuito eléctrico. Un volumen pequeño de una muestra es inyectado en uno de los extremos del capilar. El capilar pasa a través de un detector, usualmente un detector de absorción UV, en el extremo opuesto del capilar. La aplicación de un voltaje causa el movimiento de los iones de la muestra hacia su electrodo apropiado que pasa usualmente a través del detector. El gráfico de la respuesta del detector con el tiempo es generado el cual es denominado un electroferograma. Un flujo de electrolitos, conocido como flujo electroendosmótico, EOF (electroendosmotic flow), resulta en un flujo de solución a lo largo del capilar usualmente hacia el detector. Este flujo puede reducir significativamente los tiempos de análisis o forzar a un ion a superar su tendencia migratoria hacia el electrodo al cual está siendo atraído por la señal de su carga.

#### E. Agrupaciones

20 [0417] Métodos para la detección proteínica aquí presentados incluyen agrupaciones para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos.

25 [0418] Agrupaciones comprenden realizar análisis paralelos de varias muestras en contra de objetivos proteínicos conocidos. El desarrollo de varias plataformas de micro agrupaciones ha permitido significativamente y en forma acelerada la determinación de abundancia proteínica, ubicación, e interacciones en una célula o tejido. Las micro agrupaciones suministran una plataforma que permite la identificación de la interacción o función en contra de un conjunto no caracterizado de proteínas, anticuerpos o péptidos.

30 [0419] Chips que se basan pueden agrupar a proteínas en una superficie pequeña y pueden medir directamente los niveles de proteínas en tejidos utilizando imágenes que se basan en fluorescencia. Las proteínas pueden ser agrupadas en fases sólidas planas o en sistemas capilares (agrupaciones micro fluidificas), y algunas proteínas diferentes pueden ser aplicadas a estas agrupaciones. Las más populares se basan actualmente en interacciones anticuerpo - antígeno, las cuales también pueden detectar interacciones antígeno - proteína. El potencial de agrupaciones de anticuerpos es actualmente limitado debido a la disponibilidad de anticuerpos que tienen una alta especificidad (para eliminar reacciones cruzadas con proteínas no específicas dentro de la muestra) y una alta afinidad con el objetivo de interés (para permitir una detección de pequeñas cantidades dentro de una muestra). Otro reto de la tecnología de agrupaciones proteínicas es la habilidad para preservar proteínas en su forma y estado biológicamente activo. Adicionalmente al uso de anticuerpos como sondas en agrupaciones, polígononucleótidos de una sola cepa, cuya especificidad es optimizada por medio de elución in vitro (aptámeros), ofrecen una alternativa viable. Aptámeros permiten su adherencia covalente a proteínas afines por medio de una foto - reticulación, reduciendo, consecuentemente, el fondo. Manchas de proteínas no específicas son utilizadas para detectar las proteínas adheridas. La publicación internacional número WO 04/58946 titulada "Agrupaciones Proteínicas" ("Protein Arrays") describe la adherencia de polipéptidos de aminoácidos no naturales a soportes sólidos.

45 [0420] Las agrupaciones incluyen, pero no se limitan a, agrupaciones de esferas, agrupaciones que se basan en esferas, bioagrupaciones, agrupaciones bioelectrónicas, agrupaciones de cDNA, agrupaciones celulares, agrupaciones de ADN, agrupaciones genéticas, agrupaciones de expresiones genéticas, agrupaciones celulares congeladas, agrupaciones de genoma, agrupaciones de oligonucleótidos de alta densidad, agrupaciones de hibridación, agrupaciones micro ménsula, agrupaciones micro electrónicas, agrupaciones de hibridación de ADN multiplex, nano agrupaciones, agrupaciones de oligonucleótidos, agrupaciones de oligosacáridos, agrupaciones planas, agrupaciones proteínicas, agrupaciones de soluciones, agrupaciones coloreadas, agrupaciones de tejidos, agrupaciones exón, agrupaciones de filtros, micro agrupaciones, micro agrupaciones de moléculas pequeñas, agrupaciones de suspensiones, agrupaciones de temas, agrupaciones de Texas, y agrupaciones de transcripciones.

#### F. Sensores

60 [0421] Métodos para la detección proteínica aquí descritos, incluyendo sensores para detectar aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos. Los sensores pueden ser utilizados para la detección in vivo e in vitro. Los sensores pueden ser utilizados para detectar eventos tales como la adherencia de un polipéptido de aminoácidos naturales a su objetivo, cambios de conformación en un polipéptido de aminoácidos no naturales, y / o medir otras interacciones, modificaciones o cambios a un polipéptido de aminoácidos no naturales o su entorno.

65 [0422] Los sensores pueden ser sensores químicos, sensores ópticos y biosensores. Los sensores químicos son dispositivos analíticos miniatura que entrega información en tiempo real y en línea acerca de la presencia de

compuestos o iones específicos en muestras complejas. Los sensores ópticos se basan en las propiedades ópticas intrínsecas de analitos, o de propiedades ópticas de colorantes indicadores biomoléculares marcadas adheridas a los soportes sólidos. Los biosensores pueden ser biosensores de afinidad que se basan en las capacidades de las enzimas para convertir “sustratos” en productos; o biosensores catalíticos.

5 [0423] Se puede medir la adherencia de un polipéptido de aminoácidos no naturales a su objetivo, incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo, o un polipéptido que se adhiere a un antígeno o sus fragmentos. El polipéptido de aminoácidos no naturales es conjugado a una molécula tal como un nanotransmisor. Mientras está vinculado a su objetivo in vivo, el nanotransmisor emite una señal que es leída ex vivo por un  
10 instrumento de toma de imágenes médicas.

### G. Métodos para Identificar Proteínas de una Examinación de una Biblioteca

15 [0424] Para identificar a la proteína o a las proteínas del polipéptido de aminoácidos no naturales, se pueden utilizar muchos métodos. La separación proteínica ayuda a separar una mezcla compleja para que proteínas individuales sean procesadas más fácilmente con otras técnicas. Los métodos de identificación proteínica incluyen, pero no se limitan a, secuenciación de bajo caudal a través de la degradación Edman, técnicas de espectrometría de masa, toma de huellas de masa de péptidos, secuenciación de ensayos que se basan en anticuerpos y ensayos de  
20 cuantificación proteínicas tales como marcación de gel de colorantes fluorescentes o métodos de modificación química (es decir, marcadores de afinidad con isótopos codificados – ICATS - isotope-coded affinity tags, cromatografía diagonal fraccional combinada – COFRADIC - combined fractional diagonal chromatography) la proteína purificada también puede ser utilizada / la determinación de la estructura de cristal tridimensional, que puede ser utilizada para modelar interacciones inter moleculares. Métodos comunes para determinar la estructura de cristal tridimensional incluyen cristalografía de rayos X y espectroscopia NMR. A continuación se detallan algunos  
25 métodos para identificar a proteínas.

[0425] Secuenciación Proteínica: La secuenciación de la terminal N y la secuenciación de la terminal C. La secuenciación de la terminal N ayuda en la identificación de proteínas desconocidas; confirma la identidad y fidelidad proteínicas recombinantes (marco de lectura, punto de inicio de traducción, etcétera.); Ayuda a la interpretación de la  
30 información NMR y cristalográfica; demuestra grados de identidad entre proteínas; o suministra datos para el diseño de péptidos sintéticos para la generación de anticuerpos, etcétera. La secuenciación del terminal N utiliza una química degradativa bien establecida de Edman, removiendo secuencialmente residuos de aminoácidos del terminal N de la proteína e identificándolos por medio de HPLC en fases reversas. La sensibilidad es al nivel de cientos de femtomoles y lecturas de secuencia largas (20 - 40 residuos) pueden ser obtenidas de algunas decenas de picomoles de material de inicio. Proteínas puras (mayores al 90%) generan datos que son fácilmente interpretables, pero mezclas proteínicas suficientemente purificadas también pueden suministrar datos útiles, sujeto a una interpretación de datos rigurosos. Proteínas modificadas (especialmente acetiladas) en su terminal N no pueden ser  
35 secuenciadas directamente, puesto que la ausencia de un grupo amino primario liberado previene que se ejecute la química de Edman. Sin embargo, una proteólisis limitada de la proteína bloqueada (por ejemplo, utilizando bromuro de cianógeno) podría permitir que se pueda generar una mezcla de aminoácidos en cada ciclo del instrumento, que puede ser sujeto a un análisis de bases de datos para interpretar información secuencial significativa

[0426] La secuenciación de la terminal C es reconocida como una modificación post - traducción importante, que afecta críticamente a veces a la estructura y la actividad de una proteína. Varias situaciones de enfermedades han  
45 sido asociadas con un procesamiento deshabitado de proteínas y la secuenciación de la terminal C suministra una herramienta adicional para la investigación de la proteínica y mecanismos de procesamiento.

[0427] Análisis de Proteomas: Con proteínas proteómicas se pueden identificar, principalmente con algoritmos de búsqueda informáticos que se asignan gracias a un conjunto de datos de masa / intensidad adquiridos típicamente y que son generados al realizar una ionización por electrospray (ESI – electrospray ionization), desorción / ionización láser asistida por matriz (MALDI - matrix-assisted laser desorption/ionization), instrumentos de tiempo de fuga (TOF -  
50 time-of-flight), o unas trampas iónicas cuadrupolares tridimensionales en la proteína de interés.

#### Otros métodos de detección

55 [0428] Métodos adicionales de detección involucran biperidinas, coordinación radica, nanotecnología (oro), biotin-estreptavidina / avidina, UV/Vis, sistemas de los pasos que involucran un evento de vinculación y un evento de acoplamiento debido a la proximidad de un aminoácido no natural al objetivo resultando en una emisión de fluoróforo, moléculas fluorescentes / fluorogénicas que se basan en moléculas pequeñas a un aminoácido no natural presente en un polipéptido, lipocalinas (barril beta), proteínas que vinculan ácidos grasos y fluoróforos oscuridad a  
60 luz o luz a oscuridad.

### XV. Toma de imágenes y diagnósticos

[0429] Métodos para toma de imágenes y diagnósticos que utilizan aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos se presentan en este documento.

5 [0430] La toma de imágenes moleculares un campo multidisciplinario que involucra los esfuerzos de la biología molecular y celular para identificar al objetivo de toma de imágenes moleculares, radio química y química de bio  
 10 conjugación para desarrollar sondas de imágenes adecuadas, farmacología para optimizar las ondas para una eficacia de dirección óptima y cinética favorable in vivo, y técnicas de captura de imágenes para monitorear de una forma que no sea invasiva el destino de las ondas de imágenes moleculares in vivo. Aparte de sus aplicaciones  
 15 básicas de diagnóstico, las imágenes moleculares también juegan un rol en la evaluación de la eficacia de tratamientos, descubrimientos de medicamentos y comprensión de mecanismos moleculares en sistemas vivos. Sondas de imágenes moleculares (anticuerpos monoclonales, minicuerpos, proteínas, péptidos y péptido miméticos) pueden ser utilizados para la visualización y cuantificación de objetivos moleculares. La combinación de técnicas de  
 20 imágenes anatómicas (microMRI y microCT) y moleculares (imágenes microPET, microSPECT y de fluorescencia NIR) pueden permitir el obtener información molecular nacional, y monitorear la eficacia terapéutica molecular específica. Métodos para la toma de imágenes biológicas pueden ser utilizados para detectar organización espacial (es decir, distribución) y para cuantificar los constituyentes, estructuras, orgánulos y componentes administrados de tejidos naturales tales como sondas de marcación (por ejemplo, sondas fluorescentes) y medicamentos que utilizan transmisión de luz, reflexión, dispersión y estrategias de emisión fluorescente, con altas resoluciones espaciales y espectrales.

[0431] Ensayos de competición in vivo de compuestos no marcados con sondas marcadas para reactivos con características y eficacias farmacológicas conocidas pueden ser utilizados en el proceso de evaluación del medicamento. La caracterización no invasiva de dirección del medicamento, ocupación de receptores,  
 25 concentraciones requeridas para inhibición de receptores o enzimáticas efectivas, etcétera, pueden acelerar la evaluación de los compuestos nuevos. Mientras nuevos candidatos de medicamentos proceden a través de estudios fármaco - dinámicos y fármacos sintéticos, análisis de tomas de imágenes pueden monitorear cuantitativamente y repetitivamente la accesibilidad, duración o retención del objetivo en un lugar objetivo y su correlación con la eficacia del medicamento y holgura de tejidos irrelevantes.

30 [0432] En experimentos clínicos, ensayos de tomas de imágenes pueden facilitar la evaluación de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos, para sus propiedades farmacológicas y su efectividad terapéutica en pacientes. Al combinar sondas de tomas de imágenes con instrumentos de tomas de imágenes en varias modalidades que fusionan la información  
 35 estructural y funcional, los médicos pueden realizar múltiples ensayos funcionales de tomas de imágenes simultáneamente de co - análisis anatómicos. La información derivada de este péptidos estructurales y del monitoreo no invasivo repetitivo de la distribución y concentración del medicamento puede ser correlacionado con los efectos biológicos en los senderos de transducción de señalización, actividades enzimáticas objetivas, niveles de diseños activación de receptores, proliferación celular, actividad de proteasomas, etcétera, estos ensayos no invasivos  
 40 pueden permitir un monitoreo en tiempo real y la modificación de intervenciones objetivas y estrategias terapéuticas. Las tecnologías de tomas de imágenes moleculares pueden ser utilizadas para estudiar modelos de ratones en estudios pre - clínicos. Por ejemplo, muchos medicamentos para el cáncer y otras enfermedades ejercen sus efectos terapéuticos al inducir una apoptosis. La habilidad para tomar imágenes repetitivamente de respuestas apoptóticas en animales vivos puede facilitar la evaluación pre - clínica de estos medicamentos. Para estudiar ratones transgénicos, la identificación del ratón fundador que puede expresar el transgén en el patrón espacial y temporal apropiado por medio de toma de imágenes no invasivas puede permitir la identificación de fundadores sin una reproducción.

50 [0433] Las tomas de imágenes moleculares pueden suministrar la ubicación, magnitud y duración de expresión del gen terapéutico para la optimización de los protocolos de terapia genética. Las tomas de imágenes ópticas pueden acoplarse con la transferencia genética dirigida. Las tomas de imágenes polares de genes de portadores también pueden ser utilizados para monitorear la biodistribución y eficacia de las terapias que se basan en células

### ***Sondas de Tomas de Imágenes***

55 [0434] Las sondas de tomas imágenes pueden ser moléculas marcadas con radioisótopos o luz de moléculas emisoras de luz casi infrarroja (NIR - nearinfrared). La concentración y / o propiedades espectrales de las sondas de tomas de imágenes moleculares son alteradas y el proceso biológico específico que está bajo investigación. Dos tipos de sondas que pueden ser utilizadas en estudios de tomas de imágenes funcionales son, en forma de ejemplo  
 60 solamente, sondas de vinculación directa y sondas indirectas. Las sondas de vinculación directa y las sondas indirectas pueden ser polipéptidos de aminoácidos no naturales. Ejemplos de sondas de vinculación directa incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, polipéptidos de vinculación de antígenos y sus fragmento y ligandos receptores. Las sondas directas pueden ser utilizadas para detectar concentraciones de sus objetivos, puesto que su vinculación es estequiométrica. Por lo tanto, sondas directas son útiles en la investigación de objetivos que son sobre expresados en condiciones patológicas, por ejemplo, antes y después de una terapia.

65



Sondas indirectas son utilizadas para monitorear las actividades de sus objetivos macro moleculares, incluyendo actividades catalíticas. Ejemplos de tales sondas se describen por Herschman en Science (Ciencia) 2003 302:605-608.

5 **[0435]** Las ondas pueden ser desarrolladas para monitorear moléculas objetivas endógenas y procesos biológicos. Aquellas sondas pueden ser polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados). Mediadores claves y / o indicadores de procesos endógenos pueden ser investigados utilizando sondas de toma de imágenes. Sustratos para enzimas tales como quinasas o proteasas pueden ser marcados por medio de radio núcleos o moléculas fluorescentes para eventos tales como fosforilación o división de proteasas que pueden ser marcados por medio de ensayos de tomas de imágenes moleculares. Tales sondas fluorescentes que emiten luz fluorescente NIR después de la división de proteasas pueden ser denominadas sondas de Tomás de imágenes ópticas “activables”.

15 **[0436]** Sondas directas e indirectas pueden ser descubiertas por medio de examinación de alto caudal de bibliotecas químicas. Sondas directas también pueden ser descubiertas al examinar bibliotecas grandes de anticuerpos y fagos recombinantes. Aquellas bibliotecas pueden estar compuestas de polipéptidos de aminoácidos no naturales (modificados).

20 **[0437] Puntos cuánticos:** Métodos para la toma de imágenes y diagnósticos utilizando aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos aquí presentados incluyen a nanocristales semiconductores fluorescentes (también conocidos como puntos cuánticos o qdots - quantum dots). Los qdots pueden ser utilizados para el estudio de procesos intracelulares a un nivel de una sola molécula, toma de imágenes celulares de alta resolución, observación a largo plazo in vivo del tráfico celular, dirección a tumores y diagnósticos.

25 **[0438]** Los puntos cuánticos semiconductores coloidales son cristales sencillos de unos nanómetros de diámetro cuyo tamaño y forma pueden ser controladas precisamente por la duración, temperatura y moléculas ligandos utilizadas en su síntesis. Este proceso puede producir qdots que tienen una absorción y emisión que dependen de la composición y el tamaño. La absorción de un fotón con energía superior a la energía de la brecha de banda del semiconductor puede resultar en la creación de una pareja de electrón - hueco (o excitón). La absorción puede tener una probabilidad incrementada a energías más altas (es decir, longitudes de onda más cortas) y resultar en un espectro de absorción de banda ancha, en contraste a los fluoróforos estándar. Para nano cristales más pequeños que el denominado, radio de excitón Bohr (unos pocos nanómetros), los niveles de energía pueden ser cuantificados, con valores relacionados directamente al tamaño del qdot (un efecto llamado confinación cuántica, consecuentemente el nombre “puntos cuánticos”) la recombinación radioactiva de un excitón (caracterizada por una vida útil larga, que supera los 10 ns) puede conllevar a la emisión de un fotón en una banda de energía cinética estrecha. La vida útil de fluorescencia larga de los qdots puede habilitar el uso de la detección de tiempo limitado para separar su señal de aquellas con vidas útiles más cortas (tales como los fondos de auto fluorescencia que se encuentran en las células).

40 **[0439]** Qdots individuales pueden ser observados y rastreados durante un período de tiempo extendido con, por ejemplo, microscopios confocales, microscopios de reflexión interna total, o microscopios básicos de campo general de epifluorescencia. La espectroscopia de correlación de fluorescencia puede permitir la determinación del brillo por partícula y también suministra una medida del tamaño promedio de los qdots. Los qdots también pueden ser utilizados como sondas para un microscopio confocal de dos fotones puesto que se caracterizan por una absorción muy larga de la sección transversal. Pueden ser utilizados simultáneamente con colorantes estándar. Los qdots tienen un potencial como donantes personalizables de una pareja de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET - fluorescence resonance energy transfer).

50 **[0440]** Para aplicaciones tales como la marcación de qdots de una molécula objetivo tal como un polipéptido de aminoácidos no naturales, una sola fracción de reconocimiento puede ser injertada al qdot (por ejemplo, oligonucleótidos de ADN o aptámeros, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, polipéptidos vinculantes de antígenos, etcétera) o, utilizados como ligandos de solubilización de qdots. Los ligandos de qdots que contienen un grupo de aminos o carboxilo, por ejemplo, pueden ofrecer una posibilidad de reticular moléculas que contienen a un grupo de tioles o a una fracción de éster N-hidroxisuccinimilo por medio de reacciones de bioconjugación estándar. Otro método puede ser el uso de interacciones electrostáticas entre los qdots y moléculas cargadas de adaptadores, o entre qdots y proteínas modificadas para incorporar dominios cargados. Estos pasos de funcionalización pueden ser repetidos para agregar o cambiar funcionalidades. Por ejemplo, qdots cubiertos con estreptavidina pueden ser utilizados en combinación con proteínas o anticuerpos biotinilados. Un método de tres capas tal como, utilizando (I) un anticuerpo en contra de un objetivo específico, (II) un anticuerpo secundario biotinilado en contra del primer anticuerpo, y (III) un qdot cubierto de estreptavidina puede permitir la marcación de qdots de los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos, tal como se describe en este documento.

65 **[0441]** Varios grupos de adherencia superficial potenciales pueden ser utilizados para “injertar” diferentes funcionalidades a qdots individuales, resultando en sondas multipotentes. Por ejemplo, adicionalmente de a una

fracción de reconocimiento, los qdots pueden ser equipados con una capacidad de reticulación de membranas o internalización celular, y / o una función enzimática. Los péptidos pueden ser personalizados con una selección secuencial. Un intercambio surfactante de un solo paso puede generar las funciones necesarias: (I) proteger la estructura del núcleo / y del cobertor y mantener la foto física original del qdot, (II) solubilizar los qdots, (III) suministrar un interfaz biológico, y (iv) permitir la incorporación de varias funciones. Las partículas resultantes pueden tener propiedades, foto física y biocompatibilidad coloidales, y está "caja de herramienta de péptidos" puede ser personalizada para suministrar funcionalidades adicionales. Tales funcionalidades pueden ser mejoradas por medio de una evolución molecular.

5  
10  
15  
20  
[0442] Los experimentos de células vivas tales como, la marcación de células en las, la marcación de proteínas vinculadas a membranas, y la marcación de objetivos nucleares o citoplásmicos pueden ser utilizados para la detección celular o de patógenos, rastreo celular y estudios de linaje celular. Esto puede ser logrado sin ninguna funcionalización por medio de una microinyección, electroporación, o fagocitosis de qdots. Diferentes tipos de funcionalizaciones pueden ser exploradas para dirigir a qdots a proteínas de la superficie celular. Algunos ejemplos incluyen estreptavidina, anticuerpos primarios o secundarios, ligandos receptores tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF - epidermal growth factor) o serotonina, péptidos de reconocimiento y parejas de afinidad tales como biotina - avidina después de la ingeniería de la proteína objetivo. Otra estrategia podría consistir de la reticulación de anticuerpos primarios a qdots. Algunas proteínas pueden ser reconocidas por los péptidos, de tal forma que los péptidos pueden ser utilizados para funcionalizaciones de qdots. La micro inyección puede permitir la entrega de qdots funcionalizados con la secuencia de péptidos de dirección apropiados a la mitocondria o al núcleo celular. La estabilidad a largo plazo y el brillo de los qdots los convierte en candidatos para dirección y toma de imágenes en animales vivos.

25  
30  
[0443] En síntesis, nuevas composiciones pueden contener qdots, propiedades tales como (I) sensibilidad a los campos eléctricos o magnéticos; (II) emisión de fluorescencia más estrecha y vidas útiles más largas (utilizando qdots dopados con lantánidos); (III) tamaños y extensiones más pequeñas al espectro NIR, tal como se demostró por aleaciones binarias; (iv) funcionalizaciones de fin específico de los qdots de nanobarras; (v) supresión de la relación y mejora de la producción cuántica; y (vi) conmutadores incorporados de encendido y apagado o biotransductores foto eléctricos.

35  
40  
[0444] Qdots activados por la luz biotransductora podrían transferir su carga a enzimas adheridas que funcionan como aceptadores de electrones o de agujeros, que permiten su control por medio de una activación luminosa. Recíprocamente, los qdots podrían encenderse por enzimas donantes de electrones o agujeros por medio de químicos luminiscencia. La cobertura de péptidos de materiales nano puede ser una herramienta para impartir funciones novedosas al interfaz orgánico - inorgánico. La ingeniería simultánea de la brecha de banda del semiconductor (por medio de diseño racional) con el potencial redox del péptido (por medio de evolución molecular) podría utilizarse para optimizar las composiciones de qdots y las secuencias de los péptidos para vincular las propiedades deseadas ópticas, electrónicas, magnéticas y químicas. En resumen, formas diferentes, especificidades finales y composiciones pueden conllevar a arquitecturas bio - orgánicas más complejas que podrían ser aprovechadas como un interfaz optoelectrónico para la maquinaria celular.

45  
50  
[0445] Los qdots pueden ser utilizados como reactivos de contraste para tomas funcionales de imágenes con una combinación de MRI, PET, tomografías computadas y toma de imágenes de fluorescencia IR (posterior al dirigir la toma de imágenes a través del epidermis o por medio de un microscopio de fibra confocal que se basa en catéteres). Una biopsia óptica in vivo podría confirmar la patología y la terapia podría ser realizada selectivamente, localmente y temporalmente al depositar energía (rayos X monocromáticos para la absorción del revestimiento k o radiación láser IR) a los qdots objetivos. Alternamente, podría ser posible el injertar enzimas terapéuticas a la superficie de los qdots y activarlos mediante una luz, o producir radicales libres (tales como oxígeno singlete) por medio de una rotación óptica de los qdots.

#### ***Instrumentación para tomar imágenes***

55  
[0446] Varios instrumentos pueden ser utilizados para la toma de imágenes y diagnósticos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y sus fragmentos, tal como se lo describe en este documento.

60  
65  
[0447] El monitorear las sondas podría consistir de (1) un sistema de medición y (2) un software de análisis. El sistema de medición podría incluir todos los materiales ópticos, electrónicos y la forma en la cual la muestra es iluminada (por ejemplo, la selección de la fuente luminosa), la forma de medición (por ejemplo, fluorescencia o transmisión) así como la calibración más adecuada para extraer los resultados deseados de la medición. El software de análisis podría incluir todos los algoritmos de software y matemáticos necesarios para analizar y mostrar resultados importantes en una forma significativa. La medida puede ser ejecutada usando virtualmente cualquier sistema óptico adherido al sistema, por ejemplo, un microscopio normal o invertido, un microscopio de fluorescencia, lentes macro, un endoscopio y una cámara de fondo de ojo. Además, cualquier método experimental estándar puede ser utilizado, incluyendo la transmisión de luz (área brillante y área oscura), auto fluorescencia y fluorescencia de las

sondas administradas, etcétera. Las medidas de fluorescencia puede ser hechas con cualquier cubo de filtro estándar (que consiste de filtro de barrera, un filtro de excitación y un espejo dicroico), o cualquier cubo de filtro personalizado para aplicaciones sociales, siempre y cuando el espectro de emisión esté dentro del rango espectral de la sensibilidad del sistema.

5 [0448] Las bioimágenes espectrales también pueden ser utilizadas en conjunto con cualquier método de filtración espacial estándar tales como campo oscuro y contraste de fases, y aún con microscopios de luz polarizada. Las sondas marcadas con radionúclidos pueden ser detectadas por medio de PET o SPECT (tomografía de emisión de un solo fotón - single-photon emission tomography), sondas que emiten luz (emisiones fluorescentes, bioluminiscentes o NIR) pueden ser detectadas por medio de imágenes ópticas, y emisiones de ondas de radio pueden ser detectadas por medio de MRI. Dispositivos de animales pequeños pueden ser utilizados para toma de imágenes que se basan en radionúclidos (por ejemplo, toma de imágenes de fluorescencia microPET, microSPECT y NIR) pueden ayudar a obtener información molecular y funcional, y monitorear la eficacia terapéutica molecular específica.

15 [0449] Ensayos de genes de portadores no invasivos pueden ser utilizados para estudios de toma de imágenes moleculares de animales vivos. Sondas marcadas por radionúclidos pueden ser utilizadas para monitorear, en ratones vivos, la expresión de genes reportadores utilizando la sonda FESP de vinculación directa, o la quinasa 1-timidina del tipo de virus de herpes simplex (HSV1-TK). HSV1-TK puede ser monitoreado con análogos de timidina marcados con positrones. En la misma forma que FDG, la sonda de sustrato indirecta para hexoquinasa, los sustratos marcados con positrones para HSV1-TK pueden ser retenidos en las células como un resultado de la fosforilación que depende de enzimas. Para ensayos de toma de imágenes ópticas, la luz producida por las enzimas a partir de sustratos puede ser monitoreada con cámaras sensibles CCD. Nuevos genes reportadores que codifican las proteínas de fusión que pueden ser capturadas en imágenes con sondas fluorescentes, bioluminiscentes o de radionúclidos pueden permitir el estudio de un animal individual con un número de sondas diferentes de tomas de imágenes e instrumentos apropiados para distintas aplicaciones.

20 [0450] La instrumentación MicroPET puede suministrar una mejor discriminación anatómica de ensayos funcionales. Por ejemplo, señalando las ubicaciones de tumores dentro de los órganos, determinando la ubicación de migración celular más precisamente, etcétera. La demografía mediada por fluorescencia puede mejorar la resolución y la cuantificación de los procedimientos de toma de imágenes ópticas. Tecnologías de toma de imágenes espectrales pueden discriminar emisiones de varias sondas fluorescentes, permitiendo un análisis simultáneo de sondas ópticas distintas y reduciendo dramáticamente la autofluorescencia de fondo.

### 35 ***Detección de Aminoácidos No Naturales de Polipéptidos y Bibliotecas***

40 [0451] La identificación de aminoácidos que van a ser sustituidos para modular actividades o propiedades del polipéptido puede realizarse por medio de mutagénesis dirigida a lugares específicos. Los aminoácidos en los polipéptidos y las bibliotecas de polipéptidos de este invento que modulan funciones pueden identificarse o modularse al sustituir un aminoácido codificado no naturalmente en lugar de un aminoácido natural en cualquiera de las posiciones del polipéptido. Aminoácidos codificados naturalmente pueden ser sustituidos en la posición seleccionada de un polipéptido por medio de métodos conocidos en la industria, tales como la mutagénesis dirigida a sitios específicos o la mutagénesis que escanea alanina (refiérase, por ejemplo, a Cunningham et al. 1989). El procedimiento de mutagénesis de detección de alanina introduce mutaciones sencillas de alanina en un lugar seleccionado o en todo los residuos en la molécula. En vez de sustituir el aminoácido codificado naturalmente, un aminoácido codificado no naturalmente es sustituido por un aminoácido codificado naturalmente en la cadena del polipéptido. En las moléculas de polipéptidos mutantes resultantes que contienen un aminoácido codificado no naturalmente son probadas en lo que se refiere a su actividad biológica utilizando ensayos aprobados para la medición de la función del polipéptido o proteína específicos. Podría ser de interés especial las sustituciones de aminoácidos cargados codificados no naturalmente o aminoácidos neutrales codificados no naturalmente para los aminoácidos neutrales y / o cargados codificados naturalmente. Estas sustituciones podrían producir proteínas con características mejoradas o moduladas altamente deseables, tales como vinculación de receptores modulados, actividad enzimática modulada, vinculación de antígenos modulada, o aglutinamiento o solubilidad modulada.

### 55 EJEMPLOS

[0452] Los siguientes ejemplos son ofrecidos para ilustrar, pero no para limitar el invento declarado.

#### 60 Ejemplo 1

[0453] Este ejemplo describe conjugaciones que pueden ser formadas con polipéptidos de aminoácidos no naturales. Las moléculas pueden estar enlazadas directamente a uno o más aminoácidos no naturales en un polipéptido o pueden estar adheridas por medio de un enlazador, polímero, polímero soluble en agua o una molécula biológicamente activa.

65

[454] La FIG. 9 presenta ejemplos no limitantes de moléculas que están adheridas específicamente a lugares de polipéptidos por medio de una reacción que forma un enlace de oximas entre el carbonilo de un aminoácido no natural incorporado a un polipéptido y la hidroxilamina de la molécula. Las moléculas incluyen, pero no se limitan a fluoróforos, biotina y queladores que pueden adherirse a los polipéptidos de aminoácidos no naturales.

5

#### Ejemplo 2

[0455] Las resinas u otros materiales conocidos para aquellas personas en la industria pueden ser utilizados para aislar a los polipéptidos la figura 10 muestra un ejemplo de un método de purificación para un oligopéptido de aminoácidos no naturales que utiliza resina que reacciona con el aminoácido no natural. Un enlace covalente es formado entre un marcador de afinidad químicamente específico en la resina y un aminoácido no natural presente en la proteína. Aquellos enlaces son estables bajo un amplio rango de condiciones de pH y de purificación. El paso de separación puede ser realizado en modalidades alternas, incluyendo, pero sin limitarse a una modalidad de baño, permitiendo purificaciones a larga escala. La resina y los marcadores de afinidad son estables físicamente y químicamente, y por lo tanto, pueden ser utilizados para reducir el costo de las purificaciones clínicas cuando se suba la escala.

10

15

20

[0456] La separación puede ser realizada en conjunto con conjugaciones de los polipéptidos a las moléculas incluyendo pero sin limitarse a, PEG. Este método de "una olla" simplifica aún más el proceso de conjugación y reduce el costo de producción de proteínas, incluyendo, pero sin limitarse a, proteínas terapéuticas (figura 11). Otras moléculas que pueden ser conjugadas incluyen, pero no se limitan a, fluoróforos.

25

[0457] Resinas u otros materiales para purificación pueden ser seleccionados y funcionalizados de acuerdo al aminoácido no natural presente en el polipéptido. La figura 2 se muestra un ejemplo de la selección de resina y de la funcionalización.

30

[0458] Las resinas u otros materiales para purificación pueden ser funcionalizados en forma diferente dependiendo del aminoácido no natural en el polipéptido. Por ejemplo, la figura 3 muestra un ejemplo de la purificación de afinidad del polipéptido de aminoácidos no naturales usando la resina de la hidroxilamina. La figura 14 muestra un ejemplo de purificación de un polipéptido de aminoácidos no naturales utilizando una resina de aldehídos. Ejemplos no limitantes de resinas de hidroxilaminas y de aldehídos también se muestran.

35

[0459] En alguna instancia, uno o más pasos del proceso de purificación modifican a uno o más aminoácidos no naturales presentes en el polipéptido a uno o más aminoácidos no naturales.

40

[0460] La figura 15 muestra un ejemplo de purificación de proteínas naturales de precursor de aminoácidos no naturales. El aminoácido no natural es convertido a tirosina después de la liberación de la resina utilizada en el proceso de purificación. La figura 16 muestra ejemplos no limitantes de aminoácidos no naturales.

#### Ejemplo 3

##### ***Mutagénesis de detección de aminoácidos no naturales***

45

[0461] Este ejemplo detalla la clonación y expresión de un polipéptido de la hGH incluyendo un aminoácido codificado no natural en E. coli. Este ejemplo también describe un método para evaluar la actividad biológica de polipéptidos hGh.

50

[0462] Los métodos para clonar la hGh y sus fragmentos se detallan en las patentes de Estados Unidos números 4,601,980; 4,604,359; 4,634,677; 4,658,021; 4,898,830; 5,424,199; y 5,795,745. La cDNA que codifica a toda la hGh o la forma madura de la hGh que no tiene la secuencia de señal de la terminal N se muestran en las identificaciones secuenciales número: 21 y la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 22 respectivamente. Para la secuencia completa de todo el largo de aminoácidos de GH que ocurren naturalmente. Así, la secuencia de aminoácidos GH maduros que ocurren naturalmente y mutaciones que ocurren naturalmente, refiérase a la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1, IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2 y la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 3.

55

60

[0463] Un sistema introducido de traducción que comprende un ARNt ortogonal (O-tRNA - orthogonal tRNA) y una sintetasa de tARN de aminoácidos ortogonales (O-RS) es utilizado para expresar la hGh que contiene un aminoácido codificado de forma no natural a su vez, el sistema de traducción inserta el aminoácido codificado no naturalmente de en la hGH, en respuesta al codón selector codificado.

65

Tabla 1: secuencias O-RS y O-tRNA

5	SEC ID NO: 4	<i>M. jannaschii</i> mtRNA <sup>Tyr</sup> <sub>CUA</sub>	ARNt
	SEC ID NO: 5	HLADO03; un ARNt de supresor ámbar optimizado	ARNt
	SEC ID NO: 6	HL325A; un ARNt supresor de desplazamiento del marco AGGA optimizado	RS
10	SEC ID NO: 7	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de p-azido-L-fenilalanina p-Az-PheRS(6)	RS
	SEC ID NO: 8	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de p-benzoil-L-fenilalanina-p BpaRS (1)	RS
	SEC ID NO: 9	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de propargil-fenilalanina Propargil-PheRS	RS
15	SEC ID NO: 10	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de propargil-fenilalanina Propargil-PheRS	RS
	SEC ID NO: 11	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de propargil-fenilalanina Propargil-PheRS	RS
20	SEC ID NO: 12	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(1)	RS
	SEC ID NO: 13	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(3)	RS
	SEC ID NO: 14	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(4)	RS
25	SEC ID NO: 15	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(2)	RS
	SEC ID NO: 16	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de pácetil-fenilalanina (LW1)	RS
30	SEC ID NO: 17	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de pácetil-fenilalanina (LW5)	RS
	SEC ID NO: 18	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de pácetil-fenilalanina (LW6)	RS
	SEC ID NO: 19	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de pácetil-fenilalanina (AzPheRS-5)	RS
35	SEC ID NO: 20	Sintetasa de ARNt de aminoacil para la incorporación de pácetil-fenilalanina (AzPheRS-6)	RS

[0464] La transformación de *E. coli* con plásmidos que contienen el gen hGH modificado y la pareja sintetasa / ARNt de ARNt de aminoacil ortogonal (específico para el aminoácido codificado no naturalmente deseado) permite la incorporación en un lugar específico del aminoácido codificado no naturalmente en el polipéptido hGH. El *E. coli* transformado, cultivado a 37 °C en un medio que contiene 0.01 - 100 mM del aminoácido codificado no naturalmente específico, expresa al hGH modificado con una alta fidelidad y eficacia. El hGH marcado con His que contiene un aminoácido codificado no naturalmente es producido por las células anfitrionas de *E. coli* como cuerpos o agregados de ilusión. Los agregados solubilizados y purificados en lo que se refiere a afinidad bajo condiciones desnaturalizadas en 6M de HCl de guanidina. El repliegue es realizado por medio de diálisis a 4 °C durante la noche en 50 mM de TRIS-HCl, pH 8.0, 4 microM de CuSO<sub>4</sub>, y 2% (masa / volumen) de Sarkosyl. El material es dializado contra de 2mM de TRIS-HCl, pH 8.0, 100mM de NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, seguido la remoción del marcador His. Refiérase a Boissel et al., (1993) 268:15983-93. Métodos de purificación de hGH son bien conocidos en la industria y son confirmados por SDS-PAGE, análisis de Western Blot o espectrometría de masa con trampa iónica de electrospray - ionización.

[0465] Las proteínas hGH mutantes marcadas con His fueron purificadas usando la resina queladora de níquel ProBond (Invitrogen, Carlsbad, CA) por medio de los procedimientos estándar de purificación de proteínas marcadas con His suministrados por el fabricante, seguido por una columna de intercambio de aniones previo a la carga en el gel. Para evaluar aún más la actividad biológica de los polipéptidos hGH modificados, se utilizó un ensayo que mide a un marcador a partir de ese momento del proceso de la interacción de hGH con su receptor. La interacción de hGH con su receptor producido endógenamente conlleva a la fosforilación de la tirosina de un transductor y activador de señalización del miembro de la familia de transcripción, STAT5, en la línea celular de linfocitos IM-9 humano. Dos formas de STAT5, STAT5A y STAT5B fueron identificados de una biblioteca de ADNc de IM-9. Refiérase, por ejemplo, a Silva et al., Mol. Endocrinol. (1996) 10(5):508-518. El receptor de hormonas de crecimiento humanas en células IM-9 es selectivo para hormonas de crecimiento humanas puesto que ni las hormonas de crecimiento de ratas ni la prolactina humana resultaron en una fosforilación de STAT5 detectable. En una forma importante, el dominio celular de GHR (L43R) extra de rata y el hGH que contiene G120R completan efectivamente en contra de una fosforilación de pSTAT5 estimulada por hGH.

[0466] Las células IM-9 fueron estimuladas con polipéptidos hGH de este invento. Los linfocitos IM-9 humanos fueron comprados de ATCC (Manassas, VA) y cultivados en RPMI 1640 suplementados con piruvato de sodio, penicilina, estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, San Diego) y 10% de suero de ternero fetal inactivado por calor (Hyclone, Logan, UT). Las células IM-9 fueron privadas durante la noche en un medio de ensayo (RPMI libre de fenol rojo, 10mM de Hepes, 1% de FBS tratado con carbón / dextrano inactivado por el calor, piruvato de sodio, penicilina y estreptomina) antes de la estimulación con un rango de dosis de 12 puntos de polipéptidos hGH durante 10 minutos a 37 °C. Las células estimuladas fueron fijadas con un 1% de formaldehído antes de su permeabilización con un 90% lo de metanol helado durante de una hora en hielo. El nivel de fosforilación STAT5 fue detectado por medio de una marcación intracelular con un anticuerpo fosfo – STAT5 secundario (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) a la temperatura del cuarto durante 30 minutos seguido por un anticuerpo secundario conjugado con PE. La adquisición de las muestras fue realizada en la agrupación FACS con los datos adquiridos analizados en el software Flowjo (Tree Star Inc., Ashland, OR). Los valores EC<sub>50</sub> fueron derivados de las curvas de respuesta de las dosis con una intensidad fluorescente de media (MFI - mean fluorescent intensity) en contra de la concentración proteínica utilizando SigmaPlot.

[0467] La tabla 2 a continuación resume los datos IM-9 generados con polipéptidos hGH mutantes. Varios polipéptidos hGH con una sustitución de aminoácidos no naturales en diferentes posiciones fueron probados con células IM-9 humanas tal como fue descrito. Las sustituciones demostradas fueron hechas con fenilalanina de p-acetilo en las posiciones indicadas. El mismo ensayo fue utilizado para evaluar la actividad biológica de los polipéptidos hGH que contenían un aminoácido no natural que es PEGilado. De los datos demostrados en la tabla, es aparente que existen diferencias en la actividad de vinculación de receptores dependiendo de la posición en la cual el aminoácido codificado no naturalmente fue sustituido en vez de un aminoácido codificado naturalmente.

TABLA 2			
GH	EC <sub>50</sub> (Nm)	GH	EC <sub>50</sub> (Nm)
WHO WT	0.4 ± 0.1 (n=8)	G120R	>200,000
N-6His WT	0.6 ± 0.3 (n=3)	G120pAF	>200,000
rat GH WT	>200,000	G131pAF	0.8 ± 0.5 (n=3)
Y35pAF	0.7 ± 0.2 (n=4)	P133pAF	1.0
E88pAF	0.9	R134pAF	0.9 ± 0.3 (n=4)
Q91pAF	2.0 ± 0.6 (n=2)	T135pAF	0.9
F92pAF	0.8 ± 0.4 (n=9)	G136pAF	1.4
R94pAF	0.7	F139pAF	3.3
S95pAF	16.7 ± 1.0 (n=2)	K140pAF	2.7 ± 0.9 (n=2)
N99pAF	8.5	Y143pAF	0.8 ± 0.3 (n=3)
Y103pAF	130000	K145pAF	0.6 ± 0.2 (n=3)
Y111pAF	1.0	A155pAF	1.3

#### Ejemplo 4

[0468] Este ejemplo detalla la clonación y expresión de un polipéptido hIFN modificado en E. coli.

[0469] Este ejemplo demuestra como un polipéptido hIFN incluyendo un aminoácido codificado no naturalmente puede estar expresado en E. coli. Refiérase a Nagata et. al., Nature (naturaleza), vol. 284, 316-320 (1980) y la patente de Estados Unidos número 4,364,863. El ADNc que codifica a la longitud completa del hIFN y la forma madura del hIFN que no tiene la secuencia de señal de la terminal N se muestra en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 23 y la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 24, respectivamente. La hIFN de longitud completa y madura que codifica al ADNc es insertada en los vectores de expresión pBAD HISc, pET20b, y pET19b seguido por la optimización de la secuencia para clonación y expresión sin alterar la secuencia de los aminoácidos.

[0470] Un sistema de traducción introducido que comprende un tRNA ortogonal (O-tRNA - orthogonal tRNA) y una sintetasa de tRNA de aminoácil ortogonal (O-RS - orthogonal aminoacyl tRNA synthetase) son utilizados para expresar un aminoácido codificado no naturalmente que contiene un hGH. La O-RS, preferencialmente, aminoacila al O-tRNA con un aminoácido codificado no naturalmente. A su vez, el sistema de producción inserta el aminoácido codificado no naturalmente en el hGH, en respuesta a un codón selector codificado.

5 [0471] Las secuencias O-RS y O-tRNA adecuadas para su uso con la expresión de interferón incluyen aquellas mostradas en el ejemplo 3. La transformación de E. coli complacidos que contienen el gen hIFN modificado y la pareja sintetasa de tRNA / tRNA aminoacil ortogonal (específico para el aminoácido codificado no naturalmente) permite la incorporación en un lugar específico del aminoácido codificado no naturalmente en el polipéptido hIFN. El E. coli transformado, cultivado a 37 °C en un medio que contenía entre 0.01 – 100 mM del aminoácido codificado no naturalmente, expresa al hIFN modificado con alta fidelidad y eficiencia. El hIFN marcado con HIs que contiene un aminoácido codificado no naturalmente es producido por las células anfitrionas de E. coli y sus afinidades son purificada. Los métodos para la purificación de hIFN son bien conocidos en la industria y son confirmados por SDS-PAGE, análisis Western Blot o espectrometría de masa con trampa iónica de electrospray - ionización y similares.

#### Ensayos de vinculación

15 [0472] El receptor de hIFN fue preparado tal como se describió en las patentes de Estados Unidos números 6,566,132; 5,889,151; 5,861,258; 5,731,169; 5,578,707. Para un polipéptido no PEGilado que contiene un aminoácido no natural, la afinidad de la hormona para su receptor fue medida usando una técnica con un biosensor (Pharmacia) BIAcore™, que es conocida en la industria. Los ensayos del biosensor BIAcore fueron utilizados para medir las características de vinculación de las moléculas hIFN que incluían un aminoácido codificado no naturalmente sustituido en las posiciones mostradas en la Tabla 3, junto con la información de vinculación debe ser por punto a partir de la información que se muestra en la tabla, es aparente que existen diferencias en la actividad de vinculación del receptor dependiendo en la posición en la cual el aminoácido codificado no naturalmente fue sustituido en vez de un aminoácido codificado naturalmente.

Tabla 3

25

Variantes IFN $\alpha$ 2A	Kd (nM)	Variantes IFN $\alpha$ 2A	Kd (nM)
Sigma IFN $\alpha$ A	11	6His-Q61 pAF	21
6His-IFN $\alpha$ 2A	6	6His-N65pAF	7
C1SIFN $\alpha$ 2A	11	6His-E78pAF	7
C1S E107pAF	9	6His-Y89pAF	9
6His-F36S	1300	6His-E96pAF	12
6His-F38L	18	6His-1100pAF	10
6His-F38S	42	6His-G102pAF	27
6His-L9pAF	14	6His-V103pAF	14
6His-R12pAF	8	6His-T106pAF	8
6His-R13pAF	14	6His-E107pAF	5
6His-M 16pAF	18	6His-P109pAF	17
6His-I24pAF	5	6His-L110pAF	13
6His-F27pAF	8	6His-E113pAF	19
6His-K31pAF	52	6His-L117pAF	8
6His-H34pAF	4	6His-R120pAF	4
6His-G37pAF	12	6HisY122S	300
6His-P39pAF	17	6His-R125pAF	19
6His-E41pAF	16	6His-K134pAF	10
6His-N45pAF	7	6His-R149pAF	75
6His-Q48pAF	17	6His-E159pAF	3.5
6His-K49pAF	10		

#### 60 Ejemplo 5

65 [0473] Las conjugaciones y complejos entre proteínas y oligonucleótidos tienen amplias aplicaciones en diagnóstico y terapias, tales como inmunoPCR, terapias genéticas y la entrega dirigida más recientemente de RNAi. La conjugación en lugares específicos hace posible la producción de moléculas diseñadas específicamente y estructuras nano que tienen funciones novedosas. Actualmente, las conjugaciones en lugares específicos se han

logrado principalmente a través de química maleimida, en la cual una cisteína de superficie proteínica diseñada reacciona selectivamente con una malmedida para formar un tioéter. El desarrollo de la incorporación en lugares específicos de aminoácidos no naturales en polipéptidos ha hecho posible un grupo grande de químicas para la conjugación de moléculas en proteínas. Más de 30 aminoácidos codificados no naturalmente han sido incorporados en lugares específicos de proteínas. En el ejemplo, utilizando el aminoácido no natural descrito más adelante como instrumento, polígono nucleótidos fueron conjugados a proteínas en lugares específicos. Además, usando un ADN de una sola cepa como plantilla, las proteínas conjugadas fueron ensambladas en una dimensión en una forma definida.

[0474] La proteína utilizada en este experimento fue una mutación Y35 de la hormona de crecimiento humana, en la cual la tirosina 35 fue reemplazada por el aminoácido codificado no naturalmente 9.2 (esquema 1) los ADNs de una sola cepa fueron almacenados como soluciones de 25 mM en agua a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La secuencia de ssDNA FTam27 es 5'-CAG CCA GCG TGC ACG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 21). La 5' of FTam27 fue modificada con una hidrazida. La secuencia para las plantillas son FTam28-d1: 5'-CGT GCA CGC TGG CTG CGT GCA CGC TGG CTG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 21); FTam-d2: 5'-CGT GCA CGC TGG CTG T CGT GCA CGC TGG CTG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 22); FTam28-d3: 5'-CGT GCA CGC TGG CTG TT CGT GCA CGC TGG CTG: FTam28-t1 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 23); 5'-CGT GCA CGC TGG CTG CGT GCA CGC TGG CTG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 24); FTam28-t2: 5'-CGT GCA CGC TGG CTG T CGT GCA CGC TGG T CTG CGT GCA CGC TGG CTG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 25); FTam28-t3: 5'-CGT GCA CGC TGG CTG TT CGT GCA CGC TGG TT CTG CGT GCA CGC TGG CTG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 26).

#### Conjugación de ADN de cepa de una proteína:

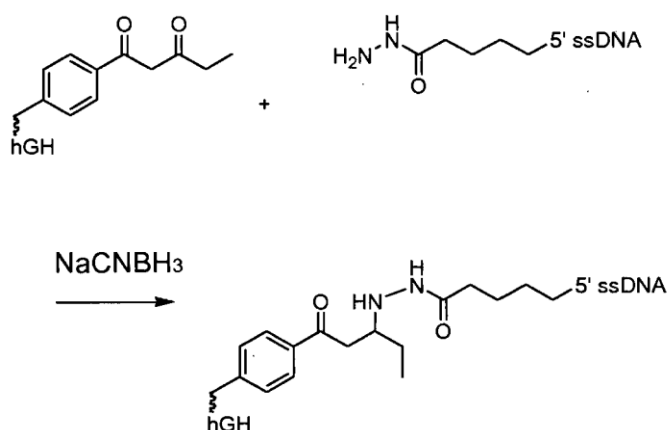
[0475] La proteína (1 mg) fue cambiada de amortiguador a un amortiguador de reacción (150 mM de NaCl, 20 mM de NaOAc, 400 mM de Arg, 5 mM de EDTA, pH 4.0) utilizando columnas de filtración de gel PD 10. La solución proteínica fue concentrada a 90  $\mu\text{l}$  utilizando 10 kD de MWCO CENTROCON (Vivascience). 5  $\mu\text{l}$  de solución de agua de 25 mM de ssDNA FTam27, que tienen una modificación de 5' de hidrazida, fue dispersada en 40  $\mu\text{l}$  de amortiguador de reacción. La solución ssDNA fue agregada lentamente a la solución proteínica. Una precipitación apareció inicialmente, pero se disolvió. 20 horas después de la incubación a  $28^{\circ}\text{C}$ , 5mM de cianoborohidrido de sodio fue agregado. La mezcla de reacción fue incubada durante de 20 horas más y sujeta a análisis y purificación.

#### Purificación de la conjugación:

[0476] 1 ml de columna de HIC de fenilo fue utilizada para la purificación de FPLC de la conjugación. El amortiguador A: 2 M de NaCl, 10 mM de Tris.HCl, pH 7.0; amortiguador B: 10 mM de Tris.HCl, pH 7.0. El gradiente utilizado en la purificación fue: 10 volúmenes de columnas (CV) 0% B, 5 CV a 50% B, mantener a 50% B por 5 CV, entonces 30 CV al 100% B. La conjugación purificada fue concentrada, y se le cambió al amortiguador a un amortiguador de almacenamiento (200 mM de NaCl, 50 mM de Tris.HCl, 1 mM de EDTA, pH 8.0) y fue sujeta a un análisis PAGE usando de 4 - 12% lo de gel SDS, a 200 V en un amortiguador MES.

#### Hibridación:

[0477] 5  $\mu\text{l}$  de conjugación proteína-ssDNA fue agregada al ssDNA complementario en un amortiguador de almacenamiento (200 mM de NaCl, 50 mM de Tris.HCl, 1 mM de EDTA, pH 8.0). Las mezclas fueron suplementadas con amortiguador de almacenamiento para dar un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  y fueron calentadas a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos, luego se enfriaron a la temperatura del cuarto. Los productos finales fueron analizados por medio de electroforesis de gel de TRI - glicina natural 125 V, a  $4^{\circ}\text{C}$  durante tres a cinco horas.





**Esquema 1.** Esquema de conjugación de la mutación hGH (Y35 / aminoácido no natural 9.2) con un ADN de una sola cepa modificado en el extremo 5' con hidrazida.

5  
 [0478] El aminoácido codificado no naturalmente 9.2, que tiene una fracción de 1,3 dicetona, fue incorporada a la hormona de crecimiento humano (hGH - human growth hormone) en la posición 35, y utilizada como un control para la conjugación con un ADN de una sola cepa de 15 mer, FTam27, modificado en el 5' con un grupo funcional de hidrazidas (esquema 1). La conjugación resultó en una hidrazona inicialmente, que se redujo aún más con cianoborohidrido para darle un enlace covalente irreversible. Con un exceso de cinco veces el ssDNA, un 70% de producción fue obtenido (Figura 17). La conjugación fue purificada a alrededor de un 90% de pureza utilizando columnas HIC y se expuso a hibridación.

15  
 [0479] La conjugación fue diseñada para hibridar con ssDNAs que tienen dos (d) o tres (t) repeticiones de secuencias complementarias tándem (FTam28) con cero (1), una (2) y dos (3) bases T entre sí como espaciadores (Figura 18). Para determinar la concentración relativa de conjugación hGH - ADN, 5 µl de la conjugación hGH - ssDNA se mezcló con una concentración de series de FTam28-d3, ADN de una sola cepa que tiene dos secuencias que se repiten complementarias a FTam27 y dos bases T como espaciadores entre ellas. El resultado fue analizado con un 14% de electroforesis de gel de glicina natural, 125 V durante tres horas a 4 grados C (Figura 19). La hibridación más completa fue con 5 µl de hGH - ssDNA mezclado con 4 µl de 10 µM de FTam28-d3 que dio una concentración de conjugación de alrededor de 16 microM. De acuerdo al gel, el monómero híbrido de hGH-ssDNA y hGH-ssDNA con FTam28-d3, fueron más móviles que la hGH en sí, presumiblemente debido al gran número de cargas negativas en el esqueleto del ADN.

25  
 [0480] Este fenómeno también fue demostrado en un experimento de control (Figura 20). Cuando la hGH fue mezclada con 1 microlitros de 100 microM de FTam28-d3. No se observó ninguna hibridación (carril cuatro). Por otro lado, cuando un micro litro de 100 microM de FTam28-d3 mezclado con una conjugación de hGH-ssDN, el dímero de la hGH es formado por medio de hibridación. No existe una interacción no específica entre la hGH y el ADN. La finalización de la hGH conjugada fue el resultado de hibridación específica del ADN. Cuando un exceso grande de FTam28-d3 fue agregado, se formaron más monómeros híbridos y menos dímeros híbridos. Hubo un monto sustancial de dímeros híbridos presentes cuando 80 picomoles de conjugación hGH - ssDNA fue mezclada con 10 equivalentes de FTam28-d3 (carril tres). Esto indicó que el dímero híbrido era más estable que cuando se hibridaba el dímero termodinámicamente.

35  
 [0481] Para demostrar el montaje de proteína - ssDNA en una forma bien definida (Figura 21), se ensamblaron seis estructuras de una dimensión de hGH usando ADN de una sola cepa como plantillas. Estas estructuras variadas por diferentes valencias y espaciadores entre cada molécula de hGH, la conjugación de hGH - ssDNA fue mezclada con un equivalente a cada una de las plantillas de ADN. Las mezclas fueron incubadas a 50 °C durante cinco minutos, se enfriaron a la temperatura del cuarto y se analizaron en un gel de glicina natural. Éstas estructuras 1-D fueron ensambladas con alta eficiencia. Desde el carril uno al carril tres muestran los resultados de la formación de dímeros con espaciadores de 0.1 y 2, respectivamente, bases T entre las repeticiones secuenciales de ADN. Desde el carril cuatro al carril seis muestran resultados de ensamblaje de formación de trímeros con espaciadores de 0.1 y 2 bases T como espaciadores.

45  
 [0482] Utilizando aminoácidos codificados no naturalmente como una herramienta de control químico, ADN de una sola cepa fue conjugado a un lugar específico de la superficie de la proteína. Esta conjugación de ADN de una sola cepa - proteína fue utilizada para ensamblar estructuras proteínicas 1-D en una forma altamente eficiente utilizando ADN como una plantilla. La conjugación de oligonucleótidos en un lugar específico también puede utilizarse para ensamblar estructuras 3-D bien definidas creando estructuras nano novedosas con funciones novedosas. Además, la tecnología de conjugación proteína - oligonucleótido puede aplicarse para crear bibliotecas "listas para usarse" de medicamentos proteínicos. En este caso, el oligonucleótido podría ser utilizado como un vinculado y un "marcador de nombre" para codificar la molécula y / o proteína pequeña individual. La conjugación proteína - oligonucleótido puede ser utilizada en inmunoPCR para aplicaciones de diagnóstico. Esta tecnología también puede ser utilizada para crear conjugaciones de ARN o APN proteínicas que pueden ser utilizadas en terapias RNAI dirigidas.

55

60

65

**Reivindicaciones**

- 5 1. Una composición que comprende a un polipéptido vinculado covalentemente a una molécula de ácido nucleico en una o más posiciones específicas de aminoácidos de aquel polipéptido, donde aquella molécula de ácido nucleico está vinculada covalentemente a una cadena lateral de aminoácidos de un aminoácido codificado no naturalmente del polipéptido mencionado.
- 10 2. Una composición de acuerdo a la reivindicación 1, donde el ácido nucleico es ADN.
- 15 3. Una composición de acuerdo a la reivindicación 2, donde el ADN es un ADN de una sola cepa (ssDNA - single stranded DNA).
- 20 4. Una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3, donde el polipéptido es un anticuerpo.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

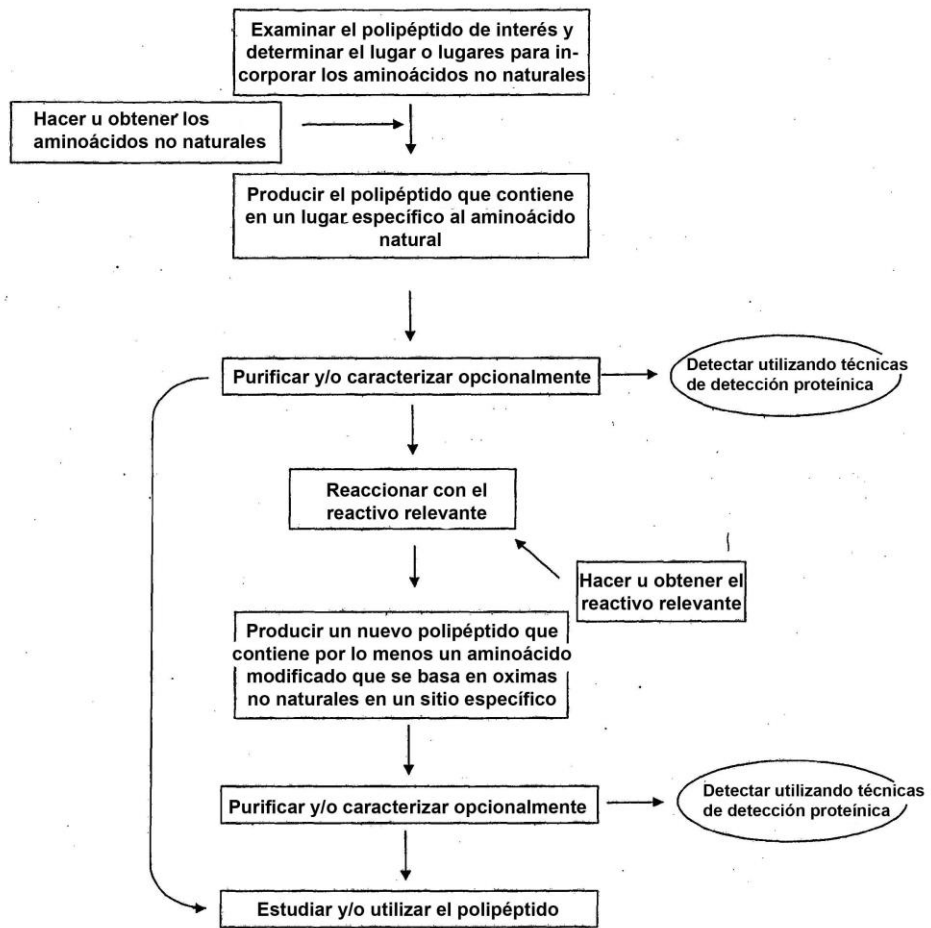


FIG. 1

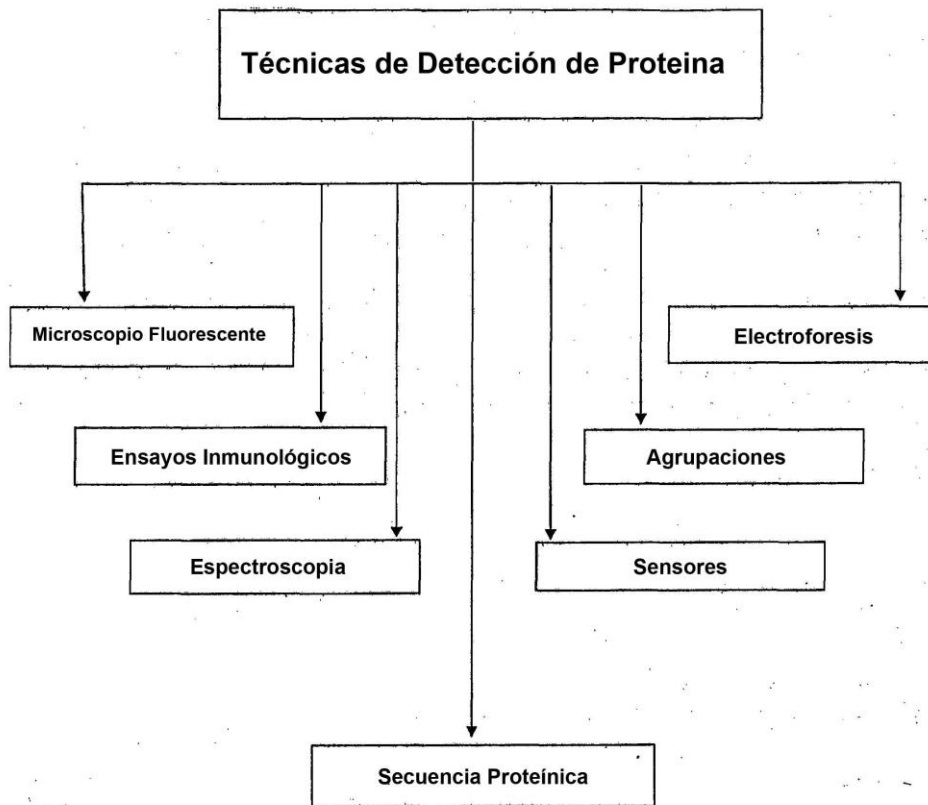
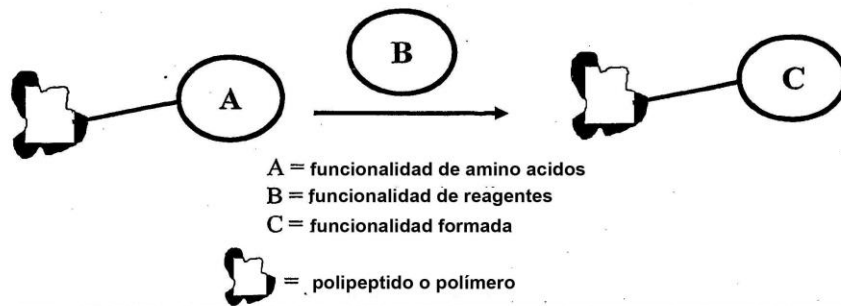


FIG.1a



Funcionalidad de Amino Acidos	Funcionalidad de Reagentes	Funcionalidad Formada
Carbonil	Hidroxilamina	Oxima
Hidroxilamina	Carbonil	Oxima
Oxima	Carbonil	Intercambio de Oxima
Dicarbonil	Hidroxilamina	Oxima
Hidroxilamina	Dicarbonil	Oxima
Oxima	Dicarbonil	Intercambio de Oxima

FIG. 2

Formación de Componentes de Aminoácidos No Naturales que Contienen Oximas por medio de una Reacción de Componentes de Aminoácidos No Naturales que Contienen Carbonilos con Reactivos que Contienen Hidroxilaminas

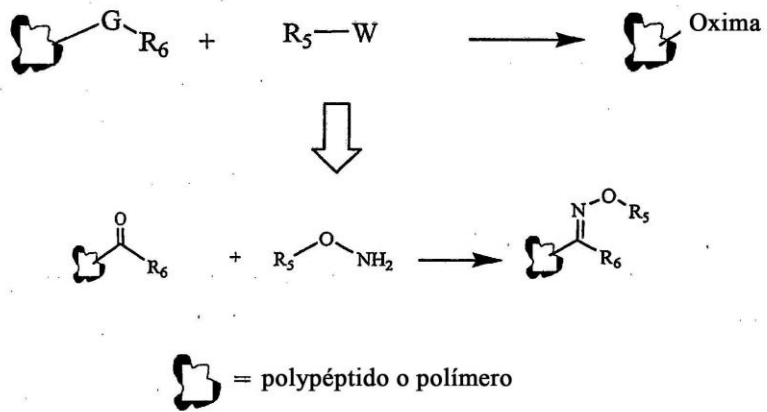


FIG. 3

Formación de Componentes de Aminoácidos No Naturales que contienen Oximas por medio de una Reacción de Componentes de Aminoácidos No Naturales que Contienen Hidroxilaminas con Reactivos que Contienen Carbonilos

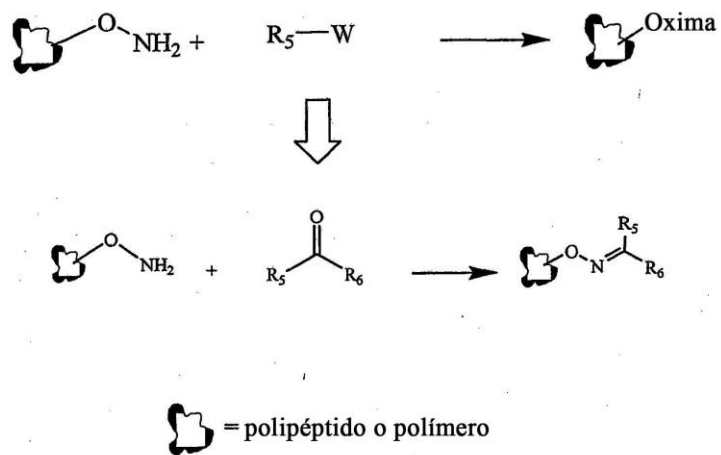
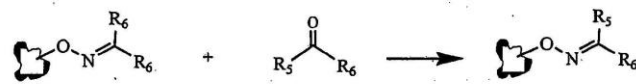
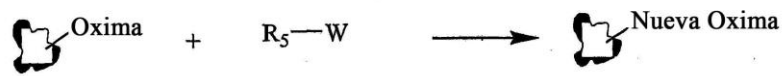


FIG. 4

Formación de Polipéptidos de Aminoácidos No Naturales que Contienen Oximas por medio de Reacciones de Intercambio de Oximas de Componentes de Aminoácidos No Naturales que Contienen Oximas con Reactivos que Contienen Carbonilos




 = polipéptido o polímero

FIG. 5



Formación de Componentes de Aminoácidos No Naturales que Contienen Oximas por medio de Reacciones de Componentes de Aminoácidos No Naturales y Contienen Dicarbonilos con Reactivos y Contienen Hidroxilaminas

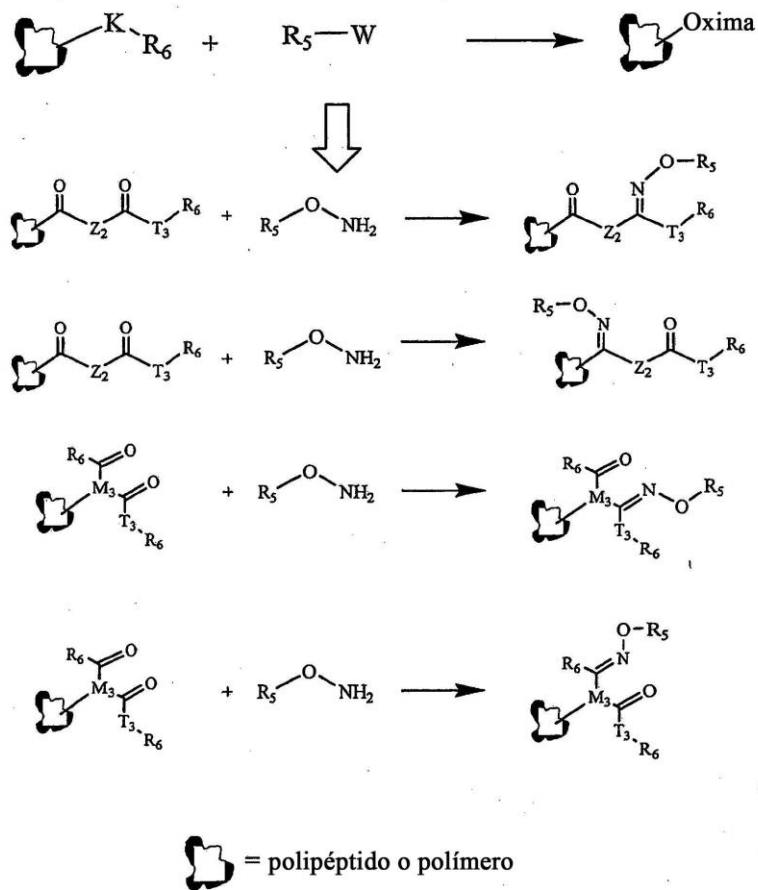


FIG. 6

Formación de Componentes de Aminoácidos No Naturales que Contienen Oximas por medio de Reacciones de Componentes de Aminoácidos No Naturales que Contienen Hidroxilaminas con Reactivos que Contienen Dicarbonilos

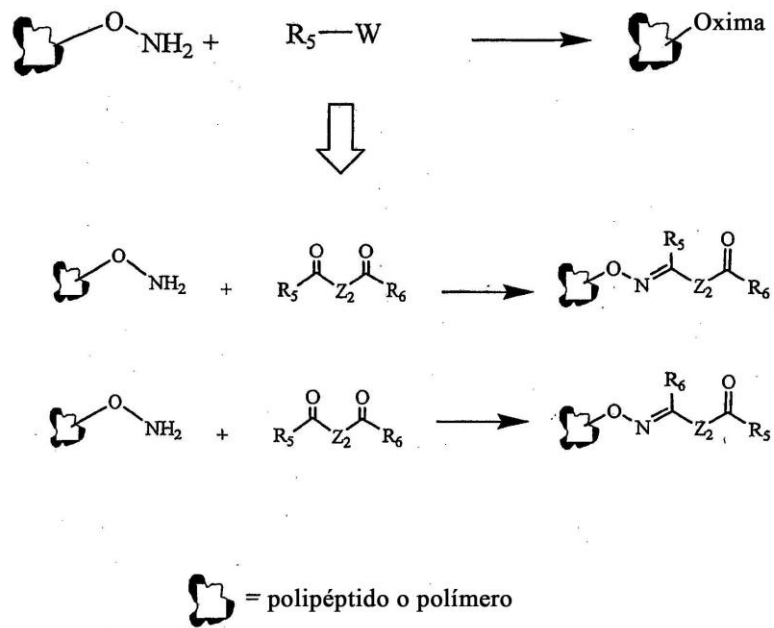


FIG. 7

Formación de Componentes de Aminoácidos No Naturales que Contienen Oximas por medio de Reacciones de Intercambio de Oximas de Componentes de Aminoácidos No Naturales que Contienen Oximas con Reactivos que Contienen Carbonilos o Dicarbonilos

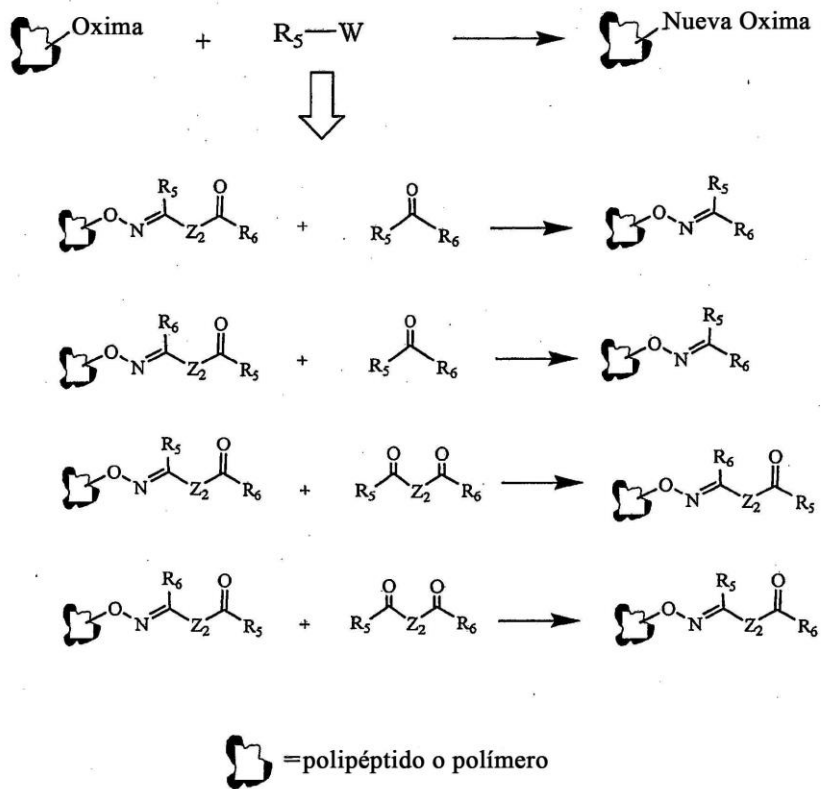
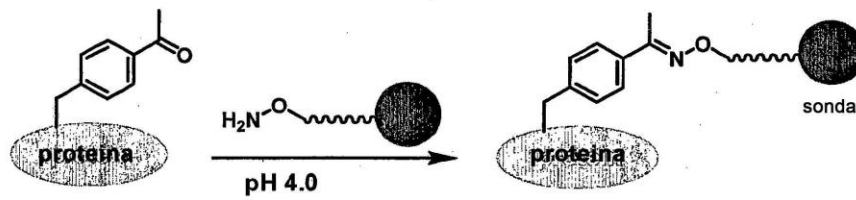
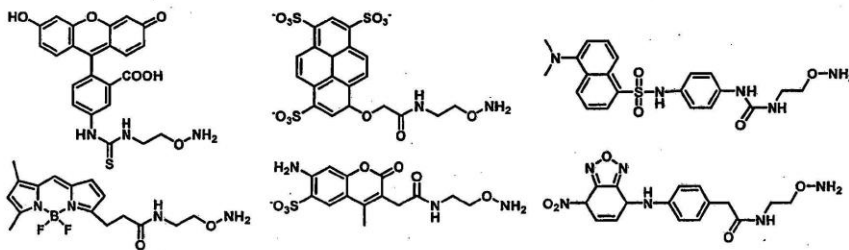


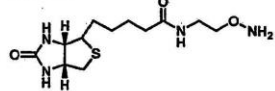
FIG. 8



Fluoróscoros:



Biotina:



Queladores:

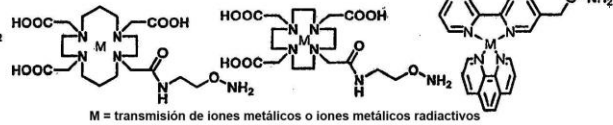


FIG. 9

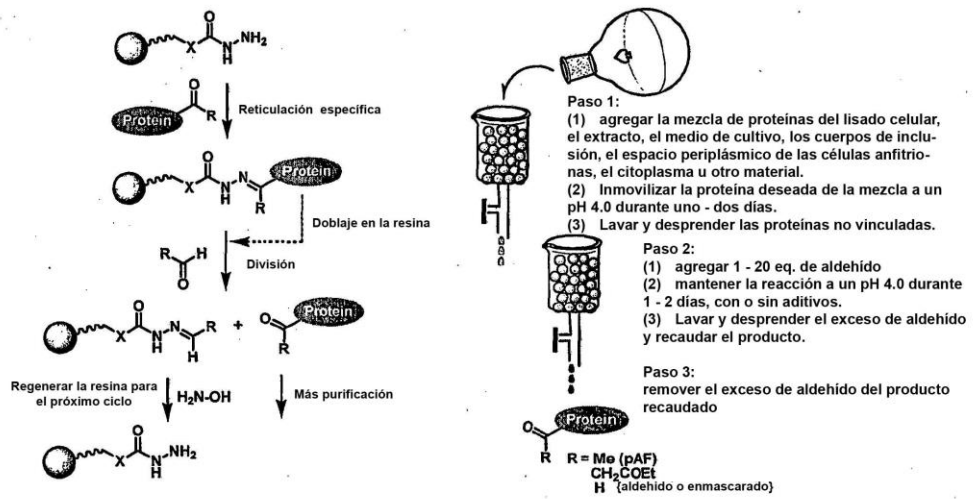


FIG. 10

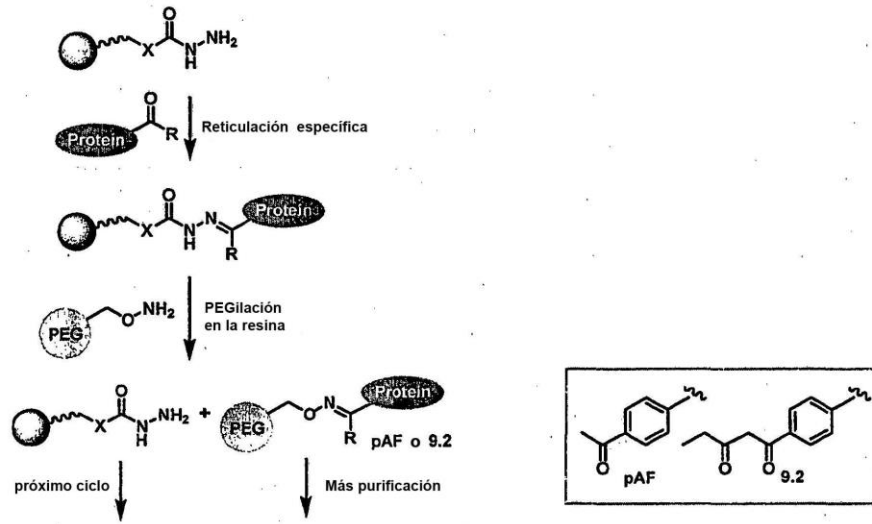


FIG. 11

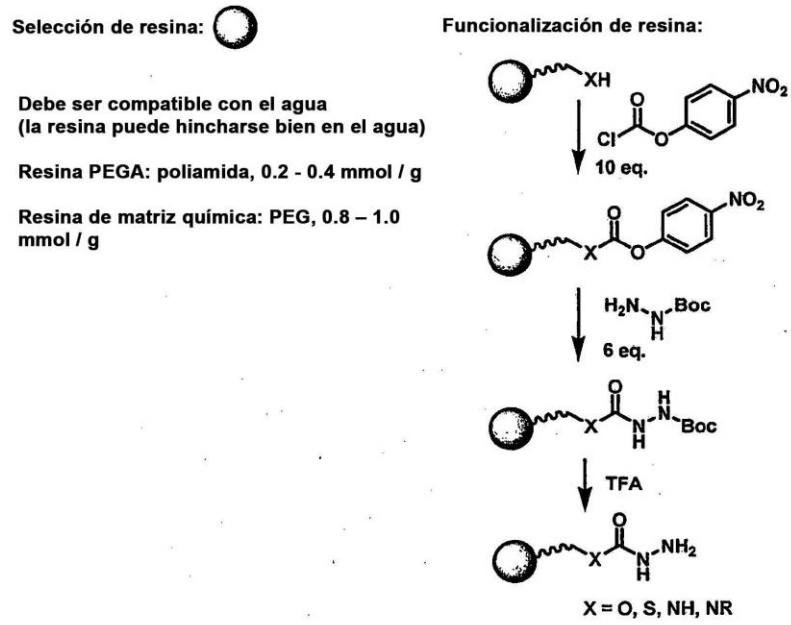
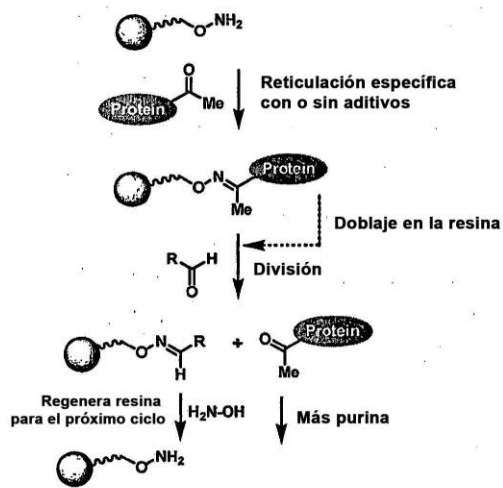


FIG. 12

**Procedimiento de Purificación:**



**Síntesis de resina hidroxilamina:**

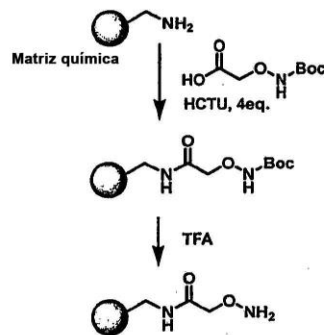


FIG. 13



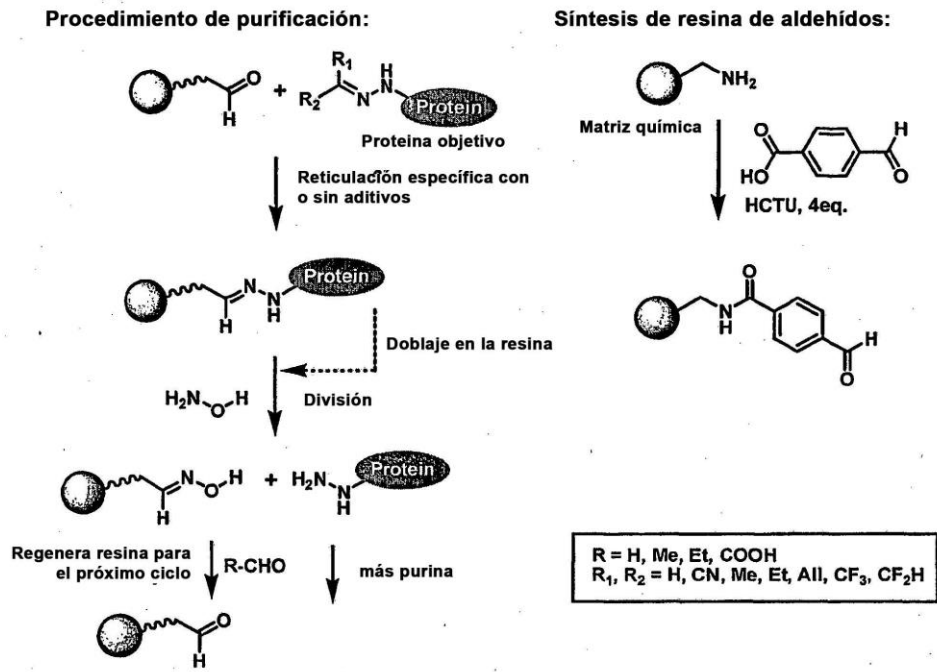


FIG. 14

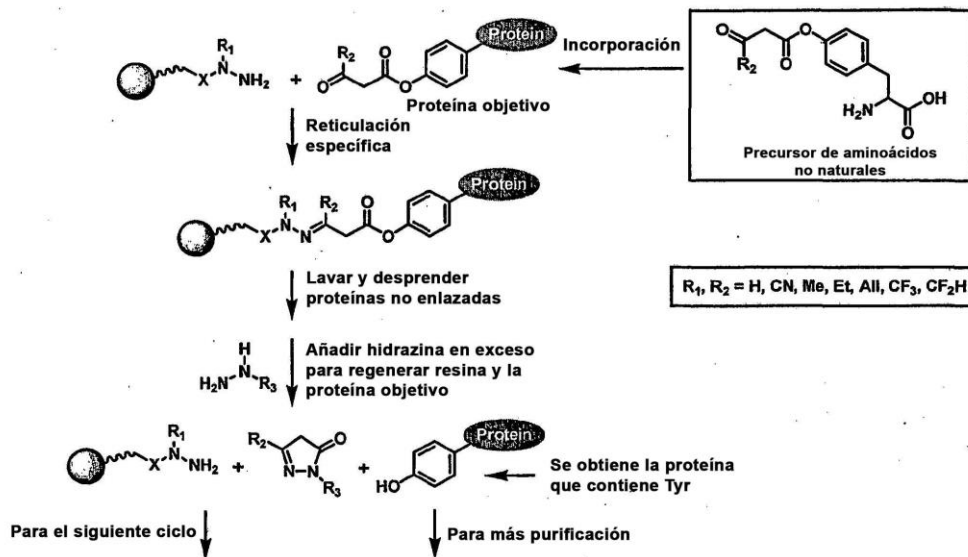


FIG. 15

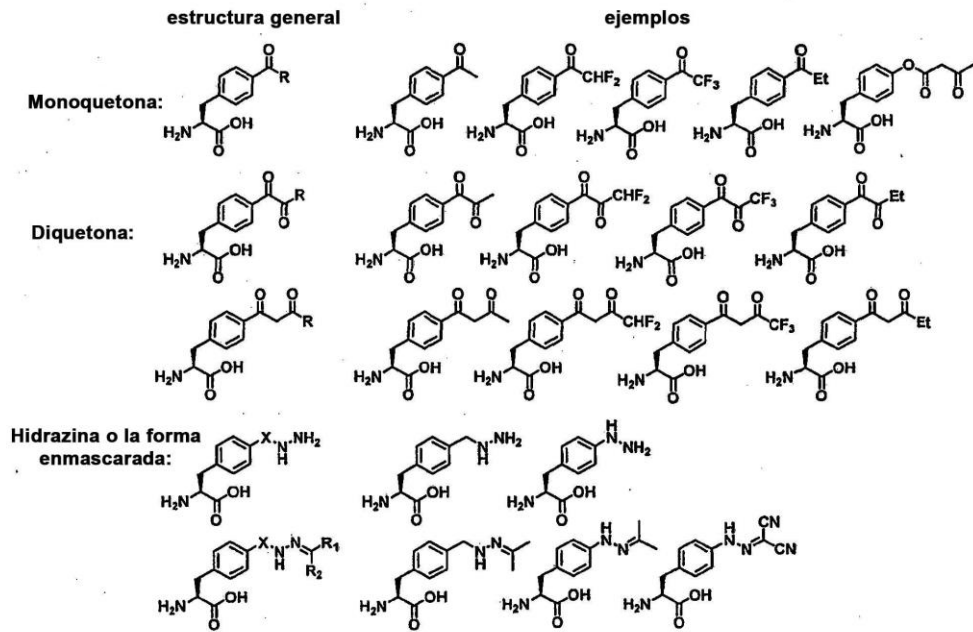


FIG. 16

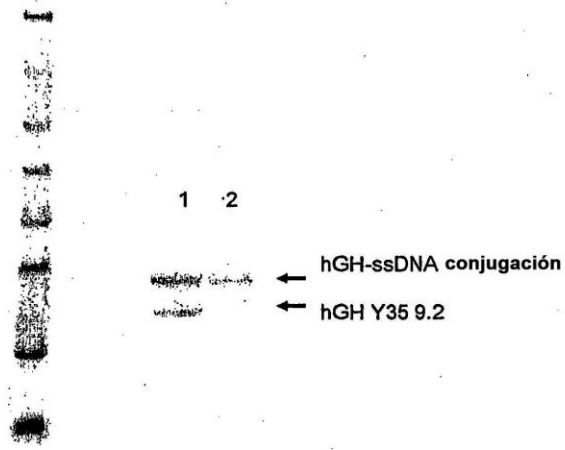


FIG. 17

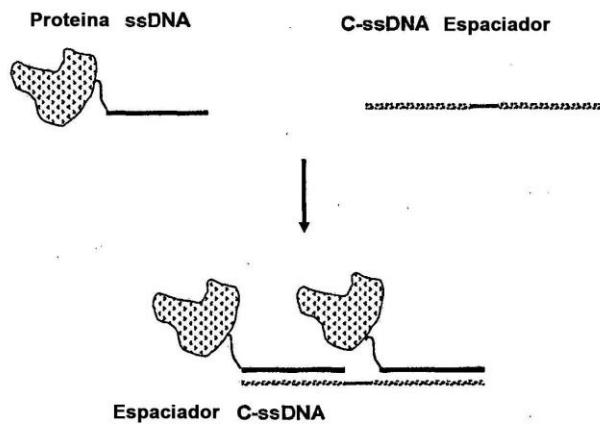


FIG. 18

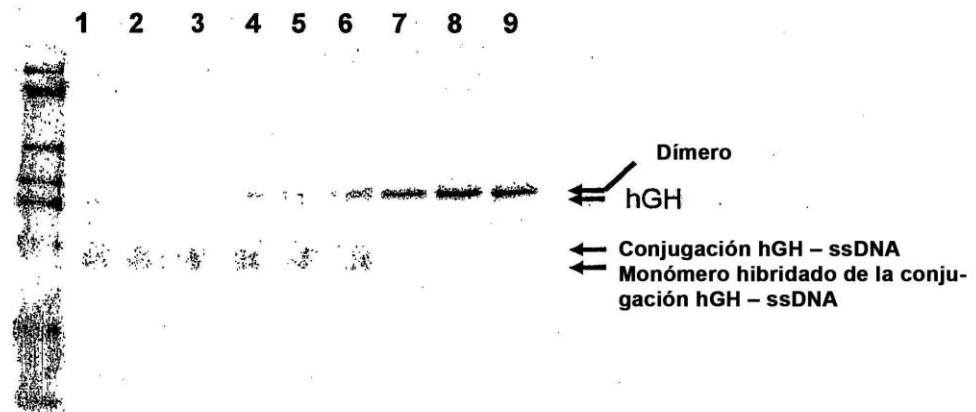


FIG. 19

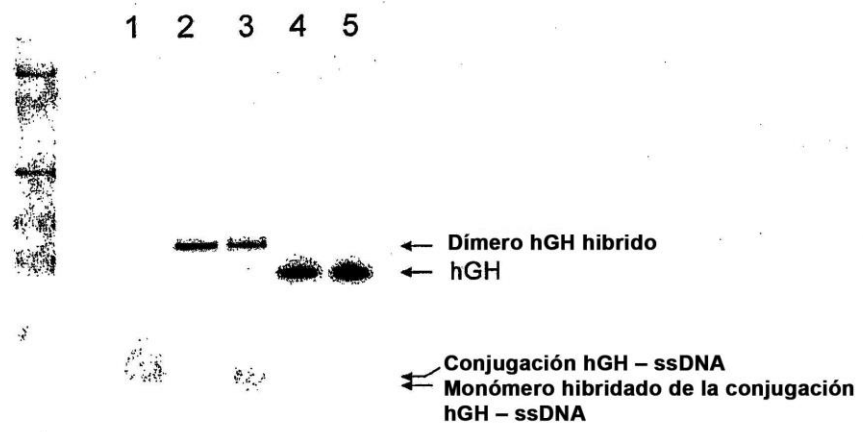


FIG. 20

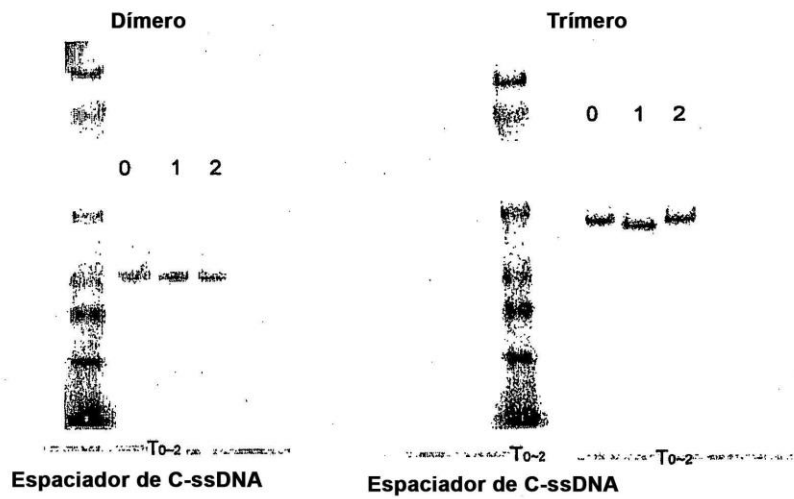


FIG. 21