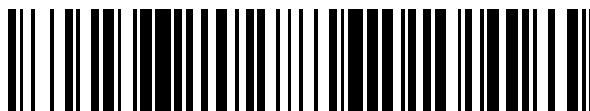


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 359**

51 Int. Cl.:

C07D 417/12	(2006.01) C07K 16/28	(2006.01)
C07D 401/12	(2006.01) A61K 39/00	(2006.01)
C07D 207/325	(2006.01)	
A61K 31/427	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
C07K 5/02	(2006.01)	
A61K 39/395	(2006.01)	
A61K 47/48	(2006.01)	
A61K 31/337	(2006.01)	
C07K 5/06	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2012 PCT/US2012/039468**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12166559**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012 E 12793459 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2714685**

54 Título: **Composiciones que contienen, métodos que implican y usos de derivados de dolastatina ligados con aminoácidos no naturales**

30 Prioridad:

27.05.2011 US 201161491076 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MIAO, ZHENWEI;
ATKINSON, KYLE, C.;
BIROC, SANDRA;
BUSS, TIMOTHY;
COOK, MELISSA;
KRAYNOV, VADIM;
MARSDEN, ROBIN;
PINKSTAFF, JASON;
SKIDMORE, LILLIAN;
SUN, YING;
SZYDLIK, AGNIESZKA y
LOPEZ DE VALENTA, DELIA IANINA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 611 359 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).

Composiciones que contienen, métodos que implican y usos de derivados de dolastatina ligados con aminoácidos no naturales

Descripción

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

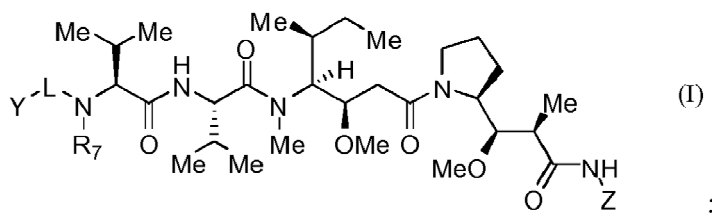
[0001] La capacidad de incorporar aminoácidos no genéticamente codificados (es decir, "aminoácidos no naturales") en proteínas permite la introducción de grupos funcionales químicos que podrían proporcionar alternativas valiosas a los grupos funcionales de origen natural, tales como epsilon -NH₂ de lisina, -SH de sulfhidrilo de la cisteína, el grupo imino de la histidina, etc. Ciertos grupos funcionales químicos son conocidos por ser inertes a los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos, genéticamente codificados comunes pero reaccionan limpia y eficientemente para formar enlaces estables con grupos funcionales que se pueden incorporar a aminoácidos no naturales.

[0002] Los métodos están disponibles ahora para introducir selectivamente grupos químicos funcionales que no se encuentran en las proteínas, que son químicamente inertes a todos los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos comunes, genéticamente codificados que se pueden usar para reaccionar de manera eficiente y selectiva con reactivos que comprenden ciertos grupos funcionales para formar enlaces covalentes estables. El documento US 2009/0047296 A1 describe conjugados de auristatina-ligando.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

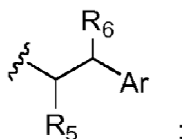
[0003] Se describe en el presente documento restos tóxicos con uno o más enlazador(es), grupos tóxicos vinculados a aminoácidos no naturales, y métodos para fabricar tales aminoácidos no naturales y polipéptidos.

[0004] La presente invención proporciona un compuesto, o sal del mismo, que comprende la fórmula (I):



donde:

Z tiene la estructura de:



R₅ es H, COR₈, alquilo C₁-C₆ o tiazol;

R₈ es OH;

R₆ es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;

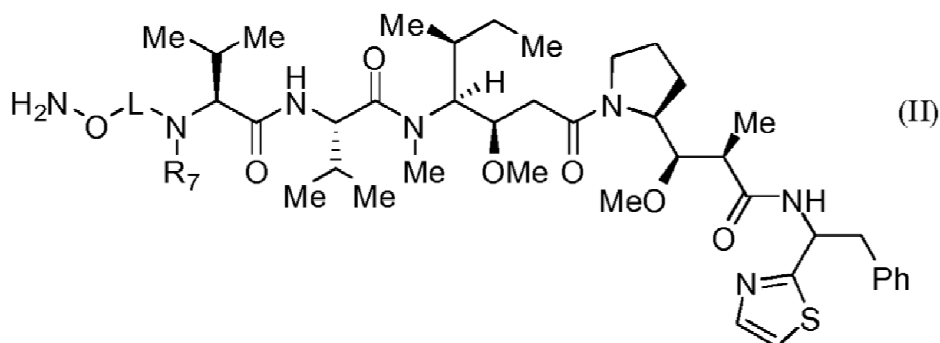
Y se selecciona del grupo que consiste en una hidroxilamina;

L es-alquilenos o -(alquilenos-O)_n-alquilenos-; y

n es un número entero mayor o igual que uno.

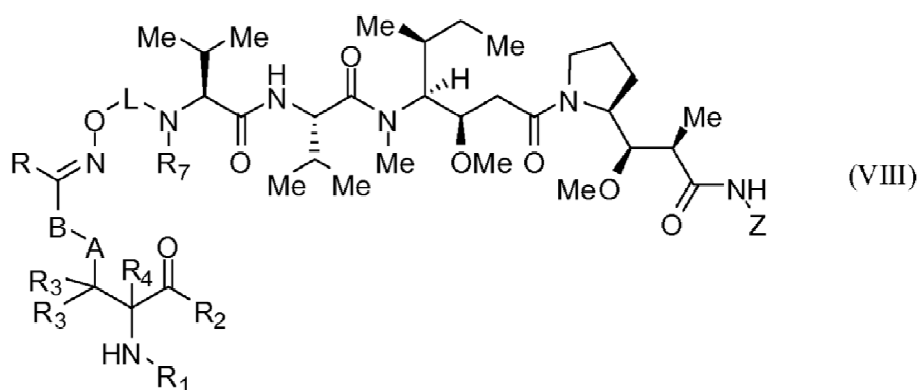
[0005] En algunas realizaciones, R₅ es tiazol. En otras realizaciones, R₆ es H. En ciertas realizaciones, Ar es fenilo. En realizaciones adicionales o adicionales, R₇ es metilo. En algunas realizaciones, n es un número entero de 0 a 20, 0 a 10 o de 0 a 5.

[0006] En algunas realizaciones, un compuesto se describe que comprende la fórmula (II):



En ciertas realizaciones, L es - (alquileo-O)_n-alquileo-. En realizaciones específicas, cada alquileo es -CH₂CH₂-, n es igual a 3, y R₇ es metilo. En otras realizaciones, L es -alquileo-. En realizaciones específicas, cada alquileo es -CH₂CH₂- y R₇ es metilo o hidrógeno.

[0007] La presente invención también proporciona un compuesto que comprende la fórmula (VIII):



donde:

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

B es opcional y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=NN(R')-, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

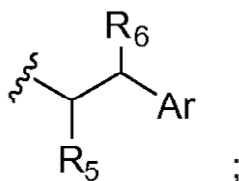
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R¹ es H, un grupo protector de amino, resina, al menos un aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

R² es OH, un grupo protector de éster, resina, al menos un aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

R³ y R⁴ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R³ y R⁴ o dos grupos R³ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

Z tiene la estructura de:

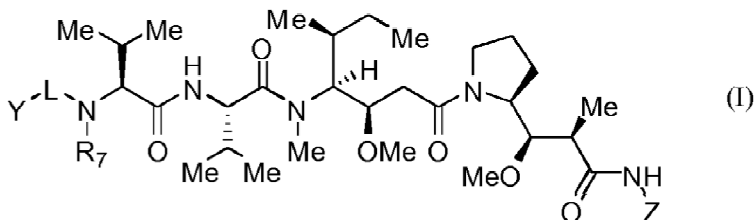


R₅ es H, CO₂H, alquilo C₁-C₆ o tiazol;
 R₆ es OH o H;
 Ar es fenilo o piridina;

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno; y
 L es -alquilen- o - (alquilen-O)_n-alquilen-; y
 n es un número entero mayor o igual que uno;
 o un solvato del mismo.

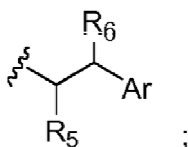
[0008] En algunas realizaciones, R₁ es un polipéptido. En realizaciones específicas, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones específicas, el anticuerpo es herceptina. En otras realizaciones, R₂ es un polipéptido. En realizaciones específicas, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones específicas, el anticuerpo es herceptina.

[0009] La presente invención también proporciona un método para la derivatización de un análogo de dolastatina que comprende la fórmula (I), el método comprende la puesta en contacto del análogo de dolastatina con un reactivo de fórmula (XXXVII), en el que la Fórmula (I) corresponde a:



donde:

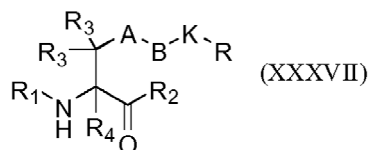
Z tiene la estructura de:



R₅ es H, COR₈, alquilo C₁-C₆ o tiazol;
 R₈ es OH;
 R₆ es OH o H;
 Ar es fenilo o piridina;

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;
 Y es NH₂-O-;
 L es -alquilen- o - (alquilen-O)_n-alquilen-; y
 n es un número entero mayor o igual que uno;

En la que la fórmula (XXXVII) corresponde a:

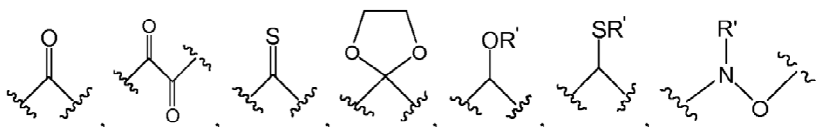


donde:

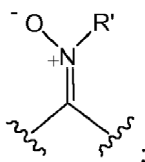
A es opcional y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k-, donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -NR'- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON (R'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN (R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo sustituido)N(R')C(O)O-, -S(O)_kN (R')-, -N(R')C(O)N (R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=NN (R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido; Cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

K es



o



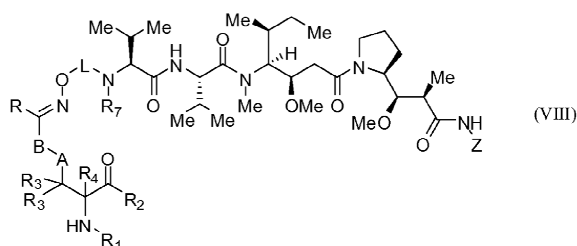
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido;

R₁ es H, un grupo protector de amino, resina, al menos un aminoácido, o polinucleótido;

R₂ es OH, un grupo protector de éster, resina, al menos un aminoácido, o polinucleótido; y

R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman, opcionalmente, un cicloalquilo o un heterocicloalquilo.

[0010] En algunas realizaciones, el análogo de dolastatina derivatizado comprende al menos una oxima que contiene aminoácido que tiene la estructura de Fórmula (VIII):



[0011] En realizaciones específicas, el análogo de dolastatina se pone en contacto con el reactivo de fórmula (XXXVII) en solución acuosa bajo condiciones ligeramente ácidas.

[0012] En ciertas descripciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los compuestos descritos y un vehículo, excipiente o aglutinante farmacéuticamente aceptable.

[0013] En descripciones posteriores o alternativas son métodos para detectar la presencia de un polipéptido en un paciente, comprendiendo el método la administración de un polipéptido que comprende al menos un aminoácido no natural que contiene heterociclo y el polipéptido de aminoácido no natural resultante que contiene heterociclo modula la inmunogenicidad del polipéptido en relación con el polipéptido de aminoácidos natural homólogo.

[0014] Se ha de entender que los métodos y composiciones descritas en este documento no se limitan a la metodología particular, protocolos, líneas celulares, construcciones, y los reactivos descritos en este documento y como tales puede variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no se destina a limitar el alcance de los métodos y composiciones descritas en el presente documento, que estarán limitados únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

[0015] Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0016] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenecen las invenciones descritas en el presente documento. Aunque se puedan usar en la práctica o pruebas de los inventos descritos aquí cualesquiera métodos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, se describen ahora los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

[0017] Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Sólo los compuestos, métodos y composiciones farmacéuticas que caen bajo las reivindicaciones forman parte de la invención.

[0018] Los términos "enlace a base de aldol" o "enlace a base aldólica mixta" se refiere a la condensación catalizada por ácido o base de un compuesto carbonilo con el enolato/enol de otro compuesto de carbonilo, que puede ser o no ser igual, para generar un compuesto de carbonilo hidroxilo β - un aldol.

[0019] El término "etiqueta de afinidad", como se usa aquí, se refiere a una etiqueta que vincula reversible o irreversiblemente otra molécula, ya sea para modificarlo, destruirlo, o formar un compuesto con él. A modo de ejemplo, los marcadores de afinidad incluyen enzimas y sus sustratos, o anticuerpos y sus antígenos.

[0020] Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tialcoxi) se utilizan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo con enlaces a las moléculas a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino, o un átomo de azufre, respectivamente.

[0021] El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otra molécula significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada, o radical de hidrocarburo cíclico, o combinación de los mismos, que puede estar totalmente saturado, mono- o poliinsaturado y puede incluir radicales di- y multivalentes, teniendo el número de átomos de carbono designados (*es decir*, C₁-C₁₀ significa uno a diez átomos de carbono). Ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexilo) 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 enlaces triples. Ejemplos de grupos alquilo insaturados 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 e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, también incluye los derivados de alquilo definidos en más detalle en la presente memoria, tales como "heteroalquilo", "haloalquilo" y "homoalquilo".

[0022] El término "alquilenio" por sí mismo o como parte de otra molécula significa un radical divalente derivado de un alcano, como se ejemplifica, por (-CH₂)_n, en donde n puede ser 1 a aproximadamente 24. A modo solamente de ejemplo, tales grupos incluyen, pero no se limitan a, grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono, tales como las estructuras -CH₂CH₂- y -CH₂CH₂CH₂CH₂-. Un "alquilo inferior" o "alquilenio inferior" es un grupo alquilo o alquilenio de cadena más corta, que generalmente tiene ocho o menos átomos de carbono. El término "alquilenio", a menos que se indique lo contrario, también se entiende que incluye los grupos descritos en la presente memoria como "heteroalquilenio".

[0023] El término "aminoácido" se refiere a que ocurre naturalmente y aminoácidos no naturales, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos codificados naturalmente son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina) y pirolisina y selenocisteína. Análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, A modo solamente de ejemplo, un α -carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (a modo de ejemplo, norleucina) o pueden tener esqueletos peptídicos modificados al tiempo que conserva la misma estructura química básica como un aminoácido de origen natural. Ejemplos no limitativos de análogos de aminoácidos incluyen homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, sulfonio de metilo de metionina.

[0024] Se puede referir a los aminoácidos en el presente documento por su nombre, sus símbolos comúnmente conocidos de tres letras o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Además, se puede referir a los nucleótidos por sus códigos de letra única comúnmente aceptados.

[0025] Un "grupo de modificación terminal amino" se refiere a cualquier molécula que puede ser unido a un grupo terminal amina. A modo de ejemplo, dichos grupos terminales amina pueden estar al final de moléculas poliméricas, en donde tales moléculas poliméricas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos y polisacáridos. Los grupos de modificación de terminus incluyen pero no se limitan a, diversos polímeros, péptidos o proteínas solubles en agua. A título solamente de ejemplo, los grupos modificadores terminales incluyen polietilenglicol o albúmina sérica. Pueden usarse grupos modificadores terminales para modificar las características terapéuticas de la molécula polimérica, incluyendo, pero sin limitarse a ello, el aumento de la vida media en suero de péptidos.

[0026] Por "fragmento de anticuerpo" se entiende cualquier forma de un anticuerpo que no sea la forma de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpo de la presente invención incluyen anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de anticuerpos de longitud completa, y anticuerpos que han sido manipulados. Los fragmentos de anticuerpo incluyen pero no se limitan a Fv, Fc, Fab y (Fab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones estructurales, regiones constantes, cadenas pesadas, cadenas ligeras y regiones variables, y moléculas no anticuerpo de andamiaje alternativo, anticuerpos biespecíficos, 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 una Fv de cadena sencilla (scFv), que comprende las regiones variables de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina, conectadas covalentemente por un enlazador peptídico (Sz Hu et al., 1996, Cancer Research, 56, 3055-3061). Estas proteínas pequeñas (MR 25.000) generalmente retienen la especificidad y afinidad por el antígeno en un solo polipéptido y pueden proporcionar un bloque de construcción conveniente para moléculas más grandes, específicas del antígeno a menos que se indique específicamente lo contrario, las declaraciones y reivindicaciones que usan el término anticuerpo o anticuerpos incluyen específicamente fragmento de anticuerpo y fragmentos de anticuerpo.

[0027] Por "conjugado anticuerpo-fármaco, o "ADC", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de anticuerpo, o fragmento del mismo, que está unido covalentemente a una o más molécula(s) biológicamente activa(s). La molécula biológicamente activa puede ser conjugado al anticuerpo a través de un enlazador, polímero u otro enlace covalente.

[0028] El término "aromático" o "arilo", como se usa aquí, se refiere a una estructura de anillo cerrado que tiene al menos un anillo que tiene un sistema de electrones pi conjugado e incluye tanto el arilo carbocíclico y arilo heterocíclico (o "heteroarilo" o "heteroaromático"). El grupo aromático carbocíclico o heterocíclico puede contener de 5 a 20 átomos en el anillo. El término incluye anillos monocíclicos enlazados covalentemente o con anillo condensado (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono). Un grupo aromático puede estar no sustituido o sustituido. Ejemplos no limitantes de grupos "aromáticos" o "arilo" incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, antraceno y fenantraceno. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos arilo y heteroarilo anotados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos en la presente memoria.

[0029] Por razones de brevedad, el término "aromático" o "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (incluyendo pero no limitado a, ariloxi, ariltioxi, aralquilo) incluye tanto arilo y anillos de heteroarilo como se define anteriormente. Por lo tanto, el término "aralquilo" o "alcarilo" pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (incluyendo pero sin limitarse a, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluyendo aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (incluyendo, pero no limitado a, un grupo metileno) ha sido reemplazado por un heteroátomo, sólo a modo de ejemplo, por un átomo de oxígeno. Ejemplos de tales grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo y similares.

[0030] El término "arileno", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical arilo divalente. Ejemplos no limitativos de "arileno" incluyen fenileno, piridinileno, pirimidinileno y tiofenileno. Los sustituyentes para grupos arileno se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos en la presente memoria.

[0031] Un "polímero bifuncional", también denominado como un "enlazador bifuncional", se refiere a un polímero que comprende dos grupos funcionales que son capaces de reaccionar específicamente con otros restos para formar enlaces covalentes o no covalentes. Tales restos pueden incluir, pero no se limitan a, los grupos laterales sobre aminoácidos naturales o no naturales o péptidos que contienen tales aminoácidos naturales o no naturales. Los otros restos que pueden estar enlazados al enlazador bifuncional o polímero bifuncional pueden ser los mismos o diferentes restos. A modo solamente de ejemplo, un enlazador bifuncional puede tener un grupo funcional reactivo con un grupo sobre un primer péptido y otro grupo funcional que es reactivo con un grupo sobre un segundo péptido, con lo que se forma un conjugado que incluye el primer péptido, el bifuncional y el segundo péptido. Se conocen muchos procedimientos y moléculas enlazadoras para la unión de diversos compuestos a péptidos. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea N° 188.256; Patentes de Estados Unidos N° 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; y 4.569.789. Un "polímero multifuncional" también denominado "enlazador multifuncional", se refiere a un polímero que comprende dos o más grupos funcionales que son capaces de reaccionar con otros restos. Tales restos pueden incluir, pero no se limitan a, los grupos laterales sobre aminoácidos naturales o no naturales o péptidos que contienen tales aminoácidos naturales o no naturales. (Incluyendo pero sin limitarse a, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un polímero bifuncional o polímero multifuncional puede tener cualquier longitud o peso molecular deseado y puede seleccionarse para proporcionar una separación o conformación particular deseada entre una o más moléculas unidas a un compuesto y las moléculas a las que se une o el compuesto.

[0032] El término "biodisponibilidad", como se usa aquí, se refiere a la velocidad y el grado al cual una sustancia o su fracción activa se suministra desde una forma de dosificación farmacéutica y se convierte en disponible en el sitio de acción o en la circulación general. Los aumentos en la biodisponibilidad se refieren al aumento de la velocidad y extensión de una sustancia o su resto activo se libera de una forma de dosificación farmacéutica y se hace disponible en el sitio de acción o en la circulación general. A modo de ejemplo, un aumento de la biodisponibilidad puede estar indicado como un aumento de la concentración de la sustancia o de su resto activo en la sangre cuando se compara con otras sustancias o fracciones activas. Un ejemplo no limitativo de un método para evaluar incrementos en la biodisponibilidad se da en los ejemplos 21-25. Este método puede usarse para evaluar la biodisponibilidad de cualquier polipéptido.

[0033] El término "molécula biológicamente activa", "resto biológicamente activo" o "agente biológicamente activo" cuando se usa en este documento significa cualquier sustancia que puede afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema biológico, camino, molécula, o interacción relacionada con un organismo, incluyendo pero no limitado a virus, bacterias, bacteriófagos, transposones, priones, insectos, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, tal como se usan en la presente memoria, las moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, ninguna sustancia destinada al diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos u otros animales o para mejorar de otro modo el bienestar físico o mental de los seres humanos o animales. Ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de moléculas pequeñas, drogas, fármacos blandos, carbohidratos, átomos o moléculas inorgánicas, colorantes, lípidos, nucleósidos, radionucleidos, oligonucleótidos, toxinas, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Las clases de agentes biológicamente activos que son adecuados para uso con los métodos y composiciones descritas en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fármacos, radionúclidos, agentes de formación de imágenes, polímeros, antibióticos, fungicidas, agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes tumorales, agentes cardiovasculares, agentes anti-ansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroidales, toxinas derivadas microbially y similares.

[0034] Por "actividad biológica de modulación" se entiende el aumento o la disminución de la reactividad de un polipéptido, la alteración de la selectividad del polipéptido, aumentando o disminuyendo la selectividad de sustrato del polipéptido. El análisis de la actividad biológica modificada puede realizarse comparando la actividad biológica del polipéptido no natural con la del polipéptido natural.

[0035] El término "biomaterial", como se usa aquí, se refiere a un material de origen biológico, incluyendo pero no limitado a material obtenido de biorreactores y/o de métodos y técnicas recombinantes.

[0036] El término "sonda biofísica", como se usa en el presente documento, se refiere a sondas que pueden detectar o vigilar los cambios estructurales en las moléculas. Tales moléculas incluyen, pero no se limitan a, proteínas y la "sonda biofísica" puede usarse para detectar o monitorizar la interacción de proteínas con otras macromoléculas. Ejemplos de sondas biofísicas incluyen, pero no se limitan a, marcadores de rotación, fluoróforos y grupos fotoactivables.

[0037] El término "biosintéticamente", como se usa aquí, se refiere a cualquier método que utiliza un sistema de traducción (celular o no celular), incluyendo el uso de al menos uno de los siguientes componentes: un polinucleótido, un codón, un ARNt, y un ribosoma. A modo de ejemplo, los aminoácidos no naturales pueden ser "incorporados biosintéticamente" en polipéptidos de aminoácidos no naturales usando los métodos y técnicas descritas en el presente documento, "generación in vivo de polipéptidos que comprenden aminoácidos no naturales", y en el ejemplo no limitativo 20. Además, los métodos para la selección de aminoácidos no naturales útiles que pueden ser "incorporados biosintéticamente" en polipéptidos de aminoácidos no naturales se describen en los

ejemplos no limitativos 20.

[0038] El término "análogo de biotina", al que también se hace referencia como "imitador de biotina", como se usa en el presente documento, es cualquier molécula, distinta de la biotina, que se unen con alta afinidad a la avidina y/o estreptavidina.

[0039] El término "carbonilo", como se usa aquí se refiere a un grupo que contiene una selección de restos del grupo que consiste de -C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂-, y -C(S)-, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, grupos que contienen al menos un grupo cetona, y/o al menos un grupo aldehído y/o al menos un grupo éster y/o al menos un grupo ácido carboxílico y/o al menos un grupo tioéster. Tales grupos carbonilo incluyen cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres y tioésteres. Además, dichos grupos pueden formar parte de moléculas lineales, ramificadas o cíclicas.

[0040] El término "grupo de modificación terminal carboxi" se refiere a cualquier molécula que puede unirse a un grupo carboxi terminal. A modo de ejemplo, tales grupos carboxilo terminales pueden estar en el extremo de moléculas poliméricas, en donde tales moléculas poliméricas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos y polisacáridos. Los grupos de modificación de terminus incluyen pero no se limitan a, diversos polímeros, péptidos o proteínas solubles en agua. A título solamente de ejemplo, los grupos modificadores terminales incluyen polietilenglicol o albúmina sérica. Los grupos modificadores terminales pueden usarse para modificar las características terapéuticas de la molécula polimérica, incluyendo, pero no limitándose a, el aumento de la vida media en suero de los péptidos.

[0041] El término "grupo químicamente escindible", al que también se hace referencia como "químicamente lábil", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que se rompe o se escinde tras la exposición a ácido, base, agentes oxidantes, agentes reductores, iniciadores químicos, o iniciadores radicales.

[0042] El término "grupo quimioluminiscente," como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que emite luz como resultado de una reacción química sin la adición de calor. A modo solamente de ejemplo, luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) reacciona con oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂ en presencia de una base y un catalizador de metal para producir un producto de estado excitado (3-aminoftalato, 3-APA).

[0043] El término "cromóforo", como se usa aquí, se refiere a una molécula que absorbe la luz de longitudes de onda visibles, las longitudes de onda UV o longitudes de onda IR.

[0044] El término "cofactor", como se usa aquí, se refiere a un átomo o molécula esencial para la acción de una molécula grande. Los cofactores incluyen, pero no se limitan a, iones inorgánicos, coenzimas, proteínas, o algún otro factor necesario para la actividad de las enzimas. Los ejemplos incluyen hemo en hemoglobina, magnesio en clorofila, e iones metálicos para proteínas.

[0045] "Co-plegado", como se usa aquí, se refiere a procesos de replegamiento, reacciones, o métodos que emplean al menos dos moléculas que interactúan entre sí y dan como resultado la transformación de moléculas plegadas o plegadas incorrectamente a moléculas plegadas correctamente. A modo solamente de ejemplo, el "co-plegado", emplea al menos dos polipéptidos que interactúan entre sí y dan lugar a la transformación de polipéptidos desplegados o mal plegados a polipéptidos nativos debidamente doblados. Dichos polipéptidos pueden contener aminoácidos naturales y/o al menos un aminoácido no natural.

[0046] Una "ventana de comparación", tal como se utiliza aquí, se refiere a un segmento de cualquiera de las posiciones contiguas utilizadas para comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean de manera óptima. Tales posiciones contiguas incluyen, pero no se limitan a un grupo que consiste de aproximadamente 20 a aproximadamente 600 unidades secuenciales, incluyendo aproximadamente 50 a aproximadamente 200 unidades secuenciales y aproximadamente 100 a aproximadamente 150 unidades secuenciales. A modo solamente de ejemplo, tales secuencias incluyen polipéptidos y polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales, con las unidades secuenciales incluyen, pero no se limitan a aminoácidos naturales y no naturales. Además, a modo solamente de ejemplo, tales secuencias incluyen polinucleótidos con nucleótidos que son las unidades secuenciales correspondientes. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, incluyendo, pero sin limitarse a, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2: 482c, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr, Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual, Por ejemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (suplemento de 1995)).

[0047] A modo de ejemplo, un algoritmo que puede ser utilizado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25: 3389 - 3402, y Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 410, respectivamente. El

software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como defecto una palabra de longitud (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como defecto una longitud de palabra de 3, y la expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST se realiza normalmente con el filtro de "baja complejidad" desactivado.

[0048] El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 90: 5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que una coincidencia entre dos nucleótidos o secuencias de aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2 o inferior a aproximadamente 0,01 o menor de aproximadamente 0,001.

[0049] El término "variantes modificadas de manera conservadora" se aplica a aminoácidos tanto naturales como no naturales y secuencias de ácidos nucleicos naturales y no naturales, y combinaciones de los mismos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las "variantes modificadas de forma conservadora" se refieren a los ácidos nucleicos naturales y no naturales que codifican secuencias de aminoácidos naturales y no naturales idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico natural y no natural no codifica una secuencia de aminoácidos natural y no natural, a secuencias esencialmente idénticas. A modo de ejemplo, debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón puede ser alterado a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones conservativamente modificadas. Así, a modo de ejemplo, cada secuencia de ácido nucleico natural o no natural en el presente documento que codifica un polipéptido natural o no natural también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico natural o no natural. Un experto en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico natural o no natural (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano) puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico natural y no natural que codifica un polipéptido natural y no natural está implícita en cada secuencia descrita.

[0050] En cuanto a las secuencias de aminoácidos, sustituciones individuales, delecciones o adiciones a un ácido nucleico, péptido, polipéptido, o secuencia de proteína que altera, añade o elimina un único aminoácido natural y no natural o un pequeño porcentaje de los recursos naturales y aminoácidos no naturales en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservadora", donde la alteración resulta en la supresión de un aminoácido, la adición de un aminoácido, o la sustitución de un aminoácido natural y no natural con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos naturales funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora se suman a y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de los métodos y composiciones descritas en el presente documento.

[0051] Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son conocidas a personas de experiencia ordinaria en la técnica. Los ocho grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

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

(véase, por ejemplo, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (WH Freeman & Co.; 2ª edición (diciembre de 1993))

[0052] Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Por lo tanto, un cicloalquilo o heterocicloalquilo incluyen vínculos de anillo saturados, parcialmente insaturados y totalmente insaturados. Además, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el

heterociclo está unido al resto de la molécula. el heteroátomo puede incluir, pero no se limita a, oxígeno, nitrógeno o azufre. Ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofurano-2-ilo, tetrahidrofurano-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares. Además, el término abarca estructuras multicíclicas, incluyendo pero no limitado a, estructuras de anillos bicíclicos y tricíclicos. Del mismo modo, el término "heterocicloalquileno" por sí mismo o como parte de otra molécula significa un radical divalente derivado de heterocicloalquilo, y el término "cicloalquileno" por sí mismo o como parte de otra molécula significa un radical divalente derivado de cicloalquilo.

[0053] El término "ciclodextrina", como se usa en el presente documento, se refiere a los hidratos de carbono cíclicos que consisten en al menos seis a ocho moléculas de glucosa en una formación de anillo. La parte exterior del anillo contiene grupos solubles en agua; en el centro del anillo se encuentra una cavidad relativamente no polar capaz de adaptarse a las moléculas pequeñas.

[0054] El término "citotóxico", tal como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto que daña a las células.

[0055] "Agente desnaturalizante" o "desnaturalizante", como se usa aquí, se refiere a cualquier compuesto o material que provocará un despliegue reversible de un polímero. A modo solamente de ejemplo, "agente desnaturalizante" o "desnaturalizantes," pueden provocar un despliegue reversible de una proteína. La fuerza de un agente desnaturalizante o desnaturalizante será determinado tanto por las propiedades y la concentración del agente desnaturalizante en particular o desnaturalizante. A modo de ejemplo, agentes desnaturalizantes o desnaturalizantes incluyen, pero no se limitan a, agentes caotrópicos, detergentes, orgánicos, disolventes miscibles en agua, fosfolípidos, o una combinación de los mismos. Ejemplos de agentes caotrópicos no limitantes incluyen, pero no se limitan a, urea, guanidina, y tiocianato de sodio. Ejemplos no limitantes de detergentes pueden incluir, pero no se limitan a, los detergentes fuertes tales como sulfato de dodecilo de sodio, o éteres de polioxietileno (por ejemplo, detergentes Tween o Triton), Sarkosyl, detergentes no iónicos suaves (por ejemplo, digitonina), detergentes catiónicos leves tales como N-> 2,3 (Dioleyoxi)-propilo-N,N,N-trimetilamonio, detergentes iónicos suaves (por ejemplo, colato de sodio o desoxicolato de sodio) o detergentes de ion híbrido, incluyendo, pero no limitado a, sulfobetaínas (Zwittergent), 3-(3-cloramidopropilo) sulfato de dimetilamonio-1-propano (CHAPS), y 3-(3-cloramidopropilo) dimetilamonio-2-sulfonato de hidroxil-1-propano (CHAPSO). Ejemplos no limitantes de disolventes orgánicos, miscibles en agua incluyen, pero no se limitan a, acetonitrilo, alcoholes inferiores (especialmente C2 - C4 alcoholes tales como etanol o isopropanol), o alcanodiolos inferiores (C2 - C4 alcanodiolos tales como etileno-glicol) pueden utilizarse como desnaturalizantes. Ejemplos de fosfolípidos no limitantes incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos de origen natural tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, y fosfatidilinositol o derivados de fosfolípidos sintéticos o variantes tales como dihexanoilfosfatidilcolina o diheptanoilfosfatidilcolino.

[0056] El término "funcionalidad deseada" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier grupo seleccionado de una etiqueta; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotoentrecruzador; un compuesto citotóxico; un fármaco; una etiqueta 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 hidrato de carbono; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo; un resto que contiene un metal; un resto radioactivo; un grupo funcional nuevo; un grupo que interactúa covalente o no covalente con otras moléculas; un resto fotoenjaulado; un resto excitable de radiación actínica; un ligando; un resto fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; un resto de la incorporación de 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; un resto tóxico; un resto isotópicamente marcado; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso de electrones; un grupo magnético; un grupo de intercalación; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo (en cuyo caso, el agente biológicamente activo puede incluir un agente con actividad terapéutica y el polipéptido de aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado puede servir ya sea como un agente co-terapéutico con el agente terapéutico adjunto o como un medio para la entrega del agente terapéutico a un sitio deseado dentro de un organismo); un marcador detectable; una molécula pequeña; un ácido ribonucleico inhibitorio; un radionucleótido; un agente de captura de neutrones; un derivado de biotina; puntos cuánticos); un nanotransmisor; un radiotransmisor; una abzima, un activador complejo activado, un virus, un adyuvante, un aglicano, un Allergan, una angiostatina, un antihormona, un antioxidante, un aptámero, una guía ARN, una saponina, un vector lanzadero, una macromolécula, un mimotopo, una receptor, una micela inversa, y cualquier combinación de los mismos.

[0057] El término "diamina," como se usa en el presente documento, se refiere a grupos/moléculas que comprenden al menos dos grupos funcionales de amina, incluyendo, pero no limitado a, un grupo hidrazina, un grupo amidina, un grupo imina, un grupo 1,1-diamina, un grupo 1,2-diamina, un grupo 1,3-diamina, y un grupo 1,4-diamina. Además, dichos grupos pueden ser parte de moléculas lineales, ramificadas, o cíclicas.

[0058] El término "marcador detectable", como se usa aquí, se refiere a una etiqueta que puede ser observable

utilizando técnicas analíticas incluyendo, pero no limitado a, fluorescencia, quimioluminiscencia, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de absorción ultravioleta/visible, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, resonancia magnética, y métodos electroquímicos.

5 **[0059]** El término "dicarbonilo" tal como se utiliza aquí se refiere a un grupo que contiene al menos dos restos seleccionados del grupo que consiste en -C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂ -, y -C(S)-, incluyendo, pero no limitado a, los grupos 1,2-dicarbonilo, grupos 1,3-dicarbonilo, y grupos 1,4-dicarbonilo, y grupos que contienen al menos un grupo de cetona, y/o al menos un grupo de aldehído y/o al menos un grupo éster y, y o al menos un grupo ácido/carboxílico, y/o al menos un grupo tioéster. Tales grupos de dicarbonilo incluyen dicetonas, cetoaldehídos, cetoácidos, cetoésteres, y cetotioésteres. Además, dichos grupos pueden ser parte de moléculas lineales, ramificadas, o cíclicas. Los dos restos en el grupo dicarbonilo pueden ser los mismos o diferentes, y pueden incluir sustituyentes que producirían, a modo solamente de ejemplo, un éster, una cetona, un aldehído, un tioéster, o una amida, en cualquiera de los dos restos .

15 **[0060]** El término "fármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia que se utiliza en la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de una enfermedad o condición.

[0061] El término "tinte", como se usa aquí, se refiere a una sustancia soluble, colorante que contiene un cromóforo.

20 **[0062]** El término "cantidad eficaz", como se usa aquí, se refiere a una cantidad suficiente de un agente o un compuesto que se administra y que aliviará en cierto grado uno o más de los síntomas de la enfermedad o condición que se está tratando. El resultado puede ser la reducción y/o alivio de los signos, síntomas, o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. A modo de ejemplo, un agente o un compuesto que se administra incluye, pero no se limita a, un polipéptido de aminoácido natural, polipéptido de aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural modificado, o polipéptido modificado de ácido no amino. Las composiciones que contienen tales polipéptidos de aminoácido natural, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados se pueden administrar para el tratamiento profiláctico, la mejora y/o tratamientos terapéuticos. Una cantidad "efectiva" apropiada en cualquier caso individual se puede determinar utilizando técnicas, tales como un estudio de escalado de dosis.

35 **[0063]** El término "grupo denso de electrones", como se usa aquí, se refiere a un grupo que dispersa electrones cuando se irradia con un haz de electrones. Tales grupos incluyen, pero no se limitan a, molibdato de amonio, yoduro de bismuto subnitrito de cadmio, 99%, carbohidrazida, hexahidrato de cloruro férrico, tetramina de hexametileno, 98,5%, anhídrido de indio tricloruro, nitrato de lantano, plomo trihidrato de acetato, trihidrato de citrato de plomo, nitrato de plomo, ácido periódico, ácido fosfomolibdico, ácido fosfotúngstico, ferricianuro potásico, ferrocianuro potásico, rojo de rutenio, nitrato de plata, proteinado plata (Ensayo Ag: 8,0-8,5%) "Fuerte", tetrafenilporfina de plata (S-TPPS), cloroaurato de sodio, tungstato sódico, nitrato de talio, tiosemicarbazida (TSC), acetato de uranilo, nitrato de uranilo, y sulfato de vanadio.

40 **[0064]** El término "agente de transferencia de energía", como se usa aquí, se refiere a una molécula que puede o bien aceptar o donar energía a partir de otra molécula. A modo solamente de ejemplo, la fluorescencia de transferencia de energía de resonancia (FRET) es un proceso de acoplamiento dipolo-dipolo por el que la energía del estado excitado de una molécula donante de fluorescencia es transferida de modo no radiativo a una molécula aceptora no excitada que después emite de modo fluorescente la energía donada en una longitud de onda más larga.

45 **[0065]** Los términos "mejorar" o "mejora" se refieren a aumentar o prolongar un efecto deseado, ya sea en potencia o duración. A modo de ejemplo, "mejorar" el efecto de los agentes terapéuticos se refiere a la capacidad de aumentar o prolongar, ya sea en potencia o duración, el efecto de los agentes terapéuticos durante el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Una "cantidad eficaz de mejora", como se usa aquí, se refiere a una cantidad adecuada para mejorar el efecto de un agente terapéutico en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición. Cuando se utiliza en un paciente, las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad y curso de la enfermedad, trastorno o afección, la terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos, y el juicio del médico tratante.

55 **[0066]** Tal como se utiliza aquí, el término "eucariota" se refiere a los organismos que pertenecen al dominio filogenético Eucarya, incluyendo pero no limitado a los animales (incluyendo, pero no limitado a, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluyendo pero no limitado a, monocotiledóneas, dicotiledóneas, y algas), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios, y protistas.

[0067] El término "ácido graso", como se usa en el presente documento, se refiere a ácidos carboxílicos con aproximadamente C6 o hidrocarburos de cadena lateral más largo.

65 **[0068]** El término "fluoróforo", como se usa aquí, se refiere a una molécula que tras la excitación emite fotones y es por lo tanto fluorescente.

[0069] Los términos "grupo funcional", "resto activo", "grupo de activación", "grupo saliente", "sitio reactivo", "grupo químicamente reactivo" y "resto químicamente reactivo", como se usa en el presente documento, se refieren a partes o unidades de una molécula a la que ocurren las reacciones químicas. Los términos son un tanto sinónimos en las técnicas químicas y se utilizan en el presente documento para indicar las porciones de moléculas que realizan alguna función o actividad y son reactivas con otras moléculas.

[0070] El término "halógeno" incluye flúor, cloro, yodo y bromo.

[0071] El término "haloacilo," como se usa en el presente documento, se refiere a grupos acilo que contienen restos de halógeno, incluyendo, pero no limitado a, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$, y similares.

[0072] El término "haloalquilo", como se usa aquí, se refiere a grupos alquilo que contienen restos de halógeno, incluyendo, pero no limitado a, $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$ y similares.

[0073] El término "heteroalquilo", como se usa aquí, se refiere a cadena lineal o ramificada, o los radicales hidrocarbonados cíclicos, o combinaciones de los mismos, que consiste en un grupo alquilo y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El/los heteroátomo(s) O, N y S y Si puede colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-OCH_3$, y $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$. Además, hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, a modo de ejemplo, $-CH_2-NH-OCH_3$ y $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$.

[0074] Los términos "vinculación en base a heterocíclico" o "heterociclo de ligamiento" se refiere a un resto formado a partir de la reacción de un grupo dicarbonilo con un grupo diamina. El producto de reacción resultante es un heterociclo, que incluye un grupo heteroarilo o un grupo heterocicloalquilo. El grupo heterociclo resultante sirve como un enlace químico entre un aminoácido no natural o un polipéptido de aminoácidos no naturales y otro grupo funcional. En una realización, el enlace heterociclo incluye un enlace heterociclo que contiene nitrógeno, incluyendo a modo solamente de ejemplo un enlace pirazol, un enlace pirrol, un enlace de indol, un enlace de benzodiazepina, y un enlace pirazalona.

[0075] De manera similar, el término "heteroalquilenos" se refiere a un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica, pero no limitado por, $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ y $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$. Para los grupos heteroalquilenos, los mismos o diferentes heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos extremos de la cadena (incluyendo pero no limitado a, alquilenoxi, alquilenamino, alquilenamino, alquilenamino, aminooxialquilenos, y similares). Aún más, para los grupos alquilenos y heteroalquilenos de unión, ninguna orientación del grupo de unión está implicada por la dirección en la que está escrita la fórmula del grupo de unión. A modo de ejemplo, la fórmula $-C(O)_2R'$ representa tanto $-C(O)_2R'$ como $-R'C(O)_2-$.

[0076] El término "heteroarilo" o "heteroaromático", como se usa aquí, se refiere a grupos arilo que contienen al menos un heteroátomo seleccionado de N, O, y S; en el que los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los grupos heteroarilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Ejemplos de grupos heteroarilo no limitativos incluyen 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenilo-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.

[0077] El término "homoalquilo", como se usa aquí, se refiere a grupos alquilo que son grupos de hidrocarburos.

[0078] El término "idéntico", como se usa aquí, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Además, la expresión "sustancialmente idénticos", como se usa aquí, se refiere a dos o más secuencias que tienen un porcentaje de unidades secuenciales que son iguales cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada medida utilizando algoritmos de comparación o mediante alineamiento manual e inspección visual. A modo solamente de ejemplo, dos o más secuencias pueden ser "sustancialmente idénticas" si las unidades secuenciales son aproximadamente 60% idénticas, aproximadamente 65% idénticas, aproximadamente 70% idénticas, aproximadamente 75% idénticas, aproximadamente 80% idénticas, aproximadamente 85% idénticas, aproximadamente 90% idénticas, o aproximadamente 95% idénticas sobre una región especificada. Tales porcentajes para describen el "porcentaje de identidad" de dos o más secuencias. La identidad de una secuencia puede existir más de una región que es al menos aproximadamente 75 a 100 unidades secuenciales de longitud, sobre una región que es de aproximadamente 50 unidades secuenciales de longitud, o, si no se especifica, a través de toda la secuencia. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. A modo solamente de ejemplo, dos o más secuencias de polipéptidos son idénticos cuando los residuos de aminoácidos son los mismos, mientras que

dos o más secuencias de polipéptidos son "sustancialmente idénticas" si los residuos de aminoácidos son aproximadamente 60% idénticos, aproximadamente 65% idénticos, aproximadamente 70% idénticos, aproximadamente 75% idénticos, aproximadamente 80% idénticos, aproximadamente 85% idénticos, aproximadamente 90% idénticos, o aproximadamente 95% idénticos sobre una región especificada. La identidad puede existir más de una región que es al menos aproximadamente 75 a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, sobre una región que es de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o, si no se especifica, a través de toda la secuencia de una secuencia de polipéptido. Además, A modo solamente de ejemplo, dos o más secuencias de polinucleótidos son idénticas cuando los residuos de ácido nucleico son los mismos, mientras que dos o más secuencias de polinucleótidos son "sustancialmente idénticas" si los residuos de ácido nucleico son aproximadamente 60% idénticos, aproximadamente 65% idénticos, aproximadamente 70% idénticos, aproximadamente 75% idénticos, aproximadamente 80% idénticos, aproximadamente 85% idénticos, aproximadamente 90% idénticos, o aproximadamente 95% idénticos sobre una región especificada. La identidad puede existir sobre una región que es al menos aproximadamente 75 a aproximadamente 100 ácidos nucleicos de longitud, sobre una región que es de aproximadamente 50 ácidos nucleicos de longitud, o, si no se especifica, a través de toda la secuencia de una secuencia de polinucleótidos.

[0079] Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la que las secuencias de prueba se comparan. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, las coordenadas de subsecuencia se designan, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Parámetros del programa por defecto se pueden utilizar, o parámetros alternativos pueden designarse. El algoritmo de comparación de secuencias después calcula las identidades de secuencia porcentual para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

[0080] El término "inmunogenicidad", como se usa aquí, se refiere a una respuesta de anticuerpo a la administración de un fármaco terapéutico. La inmunogenicidad hacia los polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos puede obtenerse usando ensayos cuantitativos y cualitativos para la detección de anticuerpos polipéptidos de aminoácidos anti-no naturales en fluidos biológicos. Tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, radioinmunoensayo (RIA), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo luminescente (LIA), e inmunoensayo fluorescente (FIA). Análisis de inmunogenicidad hacia polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos implica la comparación de la respuesta de anticuerpos tras la administración de polipéptidos de aminoácido no naturales terapéuticos de la respuesta de anticuerpos tras la administración de polipéptidos de aminoácidos naturales terapéuticos.

[0081] El término también se refiere como "agente, de intercalación" "grupo de intercalación," como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia química que se puede insertar en el espacio intramolecular de una molécula o el espacio intermolecular entre las moléculas. A modo solamente de ejemplo un agente intercalante o grupo puede ser una molécula que se inserta en las bases apiladas de la doble hélice de ADN.

[0082] El término "aislado", como se usa aquí, se refiere a la separación y la eliminación de un componente de interés a partir de componentes que no sean de interés. Sustancias aisladas pueden ser, ya sea en un estado seco o semiseco, o en solución, incluyendo pero no limitado a una solución acuosa. El componente aislado puede estar en un estado homogéneo o el componente aislado puede ser parte de una composición farmacéutica que comprende vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. La pureza y la homogeneidad pueden determinarse utilizando técnicas de química analítica, incluyendo, pero sin limitarse a, electroforesis en gel de poliácridamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Además, cuando un componente de interés es aislado y es la especie predominante presente en una preparación, el componente se describe en el presente documento como sustancialmente purificado. El término "purificado", como se usa en el presente documento, puede referirse a un componente de interés que es al menos 85% puro, al menos 90% puro, al menos 95% puro, al menos 99% puro o más. A modo solamente de ejemplo, los ácidos nucleicos o proteínas son "aislados" cuando tales ácidos nucleicos o proteínas están libres de al menos algunos de los componentes celulares con los que está asociado en el estado natural, o que el ácido nucleico o proteína se ha concentrado a un nivel mayor que la concentración de su producción in vivo o in vitro. También, a modo de ejemplo, un gen se aísla cuando se separa de los marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican una proteína que no sea el gen de interés.

[0083] El término "etiqueta", como se usa aquí, se refiere a una sustancia que se incorpora en un compuesto y se detecta fácilmente, por lo que su distribución física se puede detectar y/o monitorear.

[0084] El término "enlace", como se usa aquí para referirse a bonos o resto químico formado a partir de una reacción química entre el grupo funcional de un enlazador y otra molécula. Tales enlaces pueden incluir, pero no se limitan a, enlaces covalentes y no covalentes, mientras que tales restos químicos pueden incluir, pero no se limitan a, ésteres, carbonatos, ésteres de iminas de fosfato, hidrazonas, acetales, ortoésteres, enlaces peptídicos, y enlaces oligonucleotídicos. Enlaces hidrolíticamente estables significa que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con agua a valores de pH útiles, incluyendo pero no limitado a, en condiciones fisiológicas durante un período prolongado de tiempo, quizás incluso indefinidamente. Enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significa que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, incluyendo por ejemplo, sangre.

Enlaces enzimáticamente inestables o degradables significan que el enlace puede ser degradado por una o más enzimas. A modo solamente de ejemplo, PEG y polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en la cadena principal del polímero o en el grupo enlazador entre la cadena principal del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula de polímero. Tales enlaces degradables incluyen, pero no se limitan a las uniones éster formadas por la reacción de ácidos carboxílicos de PEG o ácidos carboxílicos de PEG activados con grupos alcohol en un agente biológicamente activo, en el que dichos grupos de éster generalmente se hidrolizan bajo condiciones fisiológicas para liberar el agente biológicamente activo. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen pero no se limitan a enlaces de carbonato; enlaces de imina resultaron de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces de éster de fosfato formados mediante la reacción de un alcohol con un grupo fosfato; vínculos de hidrazona que son producto de reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces de acetal que son el producto de reacción de un aldehído y un alcohol; ortoéster que son el producto de reacción de un formiato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, incluyendo pero no limitado a, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosforamídita, incluyendo pero no limitados a, al final de un polímero, y un grupo de hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

[0085] Los términos "medio" o "medios", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier medio de cultivo utilizado para el cultivo y las células y/o productos de cosecha expresada y/o secretada por estas células. Tal "medio" o "medios" incluyen, pero no se limitan a, solución, soportes sólidos, semi-sólido, o rígidos que pueden apoyar o contener cualquier célula huésped, incluyendo, a modo de ejemplo, las células huésped bacterianas, células huéspedes de levadura, las células huésped de insectos, células anfitrionas de plantas, células huésped eucariotas, células huésped de mamífero, células CHO, células huésped procariotas, E. coli, o células huésped de pseudomonas, y contenidos celulares. Tal "medio" o "medios" incluye, pero no se limita a, medio o medios en que la célula huésped se ha convertido en un polipéptido que ha sido secretado, incluido el medio, ya sea antes o después de una etapa de proliferación. Tal "medio" o "medios" también incluye, pero no se limita a, tampones o reactivos que contienen lisados de células huésped, a modo de ejemplo un polipéptido producido intracelularmente y se lisan o se interrumpen las células huésped para liberar el polipéptido.

[0086] El término "metabolito", como se usa aquí, se refiere a un derivado de un compuesto, a modo de ejemplo ácido polipéptido de amino natural, un polipéptido de aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural modificado, o una modificación no polipéptido de aminoácidos naturales, que se forma cuando el compuesto, a modo de ejemplo polipéptido de aminoácidos naturales, polipéptido de aminoácido no natural, polipéptido modificado de aminoácido natural, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, se metaboliza. El término "metabolito farmacéuticamente activo" o "metabolito activo" se refiere a un derivado biológicamente activo de un compuesto, a modo de ejemplo polipéptido de aminoácido natural, un polipéptido no natural de aminoácidos, un polipéptido de aminoácido natural modificado, o un polipéptido de aminoácidos no natural modificado, que se forma cuando un tal compuesto, a modo de ejemplo un polipéptido de aminoácidos natural, polipéptido de aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural modificado, o un polipéptido de aminoácido no natural modificado, se metaboliza.

[0087] El término "metabolizado", como se usa aquí, se refiere a la suma de los procesos por los cuales una sustancia particular se cambia por un organismo. Tales procesos incluyen, pero no se limitan a, reacciones de hidrólisis y reacciones catalizadas por enzimas. Información adicional sobre el metabolismo puede obtenerse de The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª Edición, McGraw-Hill (1996). A modo solamente de ejemplo, metabolitos de los polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados pueden identificarse mediante la administración de los polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados a un huésped y análisis de muestras de tejido del huésped, o mediante la incubación de los polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados con células hepáticas in vitro y análisis de los compuestos resultantes.

[0088] El término "quelante de metales", como se usa aquí, se refiere a una molécula que forma un complejo metálico con iones metálicos. A modo de ejemplo, tales moléculas pueden formar dos o más enlaces de coordinación con un ion metálico central y pueden formar estructuras de anillo.

[0089] El término como se usa aquí "resto, que contiene metal", se refiere a un grupo que contiene un ion metálico, un átomo o partícula. Dichos restos incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, iones de metal quelados (tales como níquel, hierro y platino), y nanopartículas metálicas (tales como níquel, hierro, y platino).

[0090] El término "resto que incorpora un átomo pesado," tal como se utiliza aquí, se refiere a un grupo que incorpora un ion de átomo que es generalmente más pesado que el carbono. Tales iones o átomos incluyen, pero no se limitan a, silicio, tungsteno, oro, plomo y uranio.

[0091] El término "modificado", como se usa aquí, se refiere a la presencia de un cambio a un ácido natural de amino, un aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural.

Tales cambios o modificaciones, pueden obtenerse por modificaciones de síntesis posterior de los aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales, o por modificación co-traducciona, o post-traducciona de los recursos naturales aminoácidos, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales. La forma "modificada o no modificada" significa que el aminoácido natural, aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural o polipéptido de aminoácido no natural que se discuten se modifican opcionalmente, es decir, el aminoácido natural, aminoácido no natural, polipéptido de aminoácidos natural o polipéptido de aminoácidos no natural en discusión pueden modificarse o no modificarse.

[0092] Tal como se utiliza aquí, el término "vida media en suero modulado" se refiere a cambios positivos o negativos en la vida media en circulación de una molécula biológicamente activa modificada con respecto a su forma no modificada. A modo de ejemplo, las moléculas biológicamente activas modificadas incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos natural, aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural o polipéptido de aminoácido no natural. A modo de ejemplo, vida media en suero se mide tomando muestras de sangre en diversos puntos temporales después de la administración de la molécula biológicamente activa o molécula biológicamente activa modificada, y determinando la concentración de esa molécula en cada muestra. La correlación de la concentración en suero con el tiempo permite el cálculo de la vida media en suero. A modo de ejemplo, vida media en suero modulada puede tener un aumento en la vida media en suero, lo que puede permitir mejores regímenes de dosificación o evitar los efectos tóxicos. Tales aumentos en el suero pueden ser en al menos aproximadamente dos veces, al menos aproximadamente tres veces, al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente diez veces. Un ejemplo no limitante de un método para evaluar los aumentos en la vida media en suero se da en el ejemplo 33. Este método se puede utilizar para evaluar la vida media en suero de cualquier polipéptido.

[0093] El término "vida media terapéutica modulada", como se usa aquí, se refiere a un cambio positivo o negativo en la vida media de la cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biológicamente activa modificada, con respecto a su forma no modificada. A modo de ejemplo, moléculas biológicamente activas modificadas incluyen, pero no se limitan a, aminoácido natural, aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural o polipéptido de aminoácido no natural. A modo de ejemplo, la vida media terapéutica se mide mediante la medición de la farmacocinética y/o propiedades farmacodinámicas de la molécula en diversos puntos temporales después de la administración. Vida media terapéutica incrementada puede permitir un régimen de dosificación beneficioso particular, una dosis total beneficiosa en particular, o evita un efecto no deseado. A modo de ejemplo, el aumento de la vida media terapéutica puede ser el resultado de aumento de potencia, aumento o disminución de unión de la molécula modificada a su diana, un aumento o disminución de otro parámetro o mecanismo de acción de la molécula no modificada, o un aumento o disminución de la descomposición de las moléculas de enzimas, tales como, a modo solamente de ejemplo, proteasas. Un ejemplo no limitante de un método para evaluar los aumentos en vida media terapéutica se da en el ejemplo 33. Este método se puede utilizar para evaluar la vida media terapéutica de cualquier polipéptido.

[0094] El término "nanopartículas", como se usa aquí, se refiere a una partícula que tiene un tamaño de partícula entre aproximadamente 500 nm a aproximadamente 1 nm.

[0095] El término "casi estequiométrico," como se utiliza aquí, se refiere a la relación de los moles de los compuestos que participan en una reacción química siendo de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 1,5.

[0096] Tal como se utiliza aquí, el término "no eucariota" se refiere a organismos que no son eucariotas. A modo de ejemplo, un organismo no eucariota puede pertenecer al Eubacteria, (que incluye pero no se limita a, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, o *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*), dominio filogenético, o la Archaea, la cual incluye, pero no se limita a, *Methanococcus jannaschii*, *Metanobacterium thermoautotrophicum*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuryopyrum pernix*, o *Halobacterium* tales como *Haloferax volcanii* y especies de *Halobacterium* NRC-1, o el dominio filogenético.

[0097] 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 como sinónimos con el término "aminoácido no natural" es "aminoácido no naturalmente codificado", "aminoácido no natural", "aminoácido de origen no natural", y versiones diversamente compuestas y versiones no compuestas de los mismos. El término "aminoácido no natural" incluye, pero no se limita a los ácidos, aminoácidos que se producen de forma natural mediante la modificación de un aminoácido codificado de forma natural (incluyendo, pero no limitado a, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y seleniocisteína) pero no se incorporan en sí mismos en una cadena polipeptídica en crecimiento por el complejo de la traducción. Los ejemplos de aminoácidos de origen natural que no son codificados de forma natural incluyen, pero no se limitan a, N-acetilglucosaminil-L-serina, N-acetilglucosaminil-L-treonina, y O-fosfotirosina. Además, el término "aminoácido no natural" incluye, pero no está limitado a, aminoácidos que no ocurren de forma natural y se pueden obtener sintéticamente o pueden obtenerse por modificación de aminoácidos no naturales.

[0098] El término "ácido nucleico", como se usa aquí, se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos,

ribonucleósidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono- o bicatenaria. A modo de único ejemplo, tales ácidos nucleicos y polímeros de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, (i) análogos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares como el ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a nucleótidos de origen natural; (ii) análogos de oligonucleótidos que incluye, pero no se limitan a, PNA (ácido peptidonucleic), análogos de ADN utilizados en la tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforamidatos, y similares); (iii) variantes modificadas de manera conservadora (incluyendo, pero no limitado a, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias y la secuencia indicada explícitamente. A modo de ejemplo, sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) están sustituidos con base mixta y/o residuos de desoxiinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al, J. Biol Chem 260.: 2605-2608 (1985); y Rossolini et al, Mol Cell Probes 8: 91-98 (1994)).

[0099] El término "agente oxidante", como se usa aquí, se refiere a un compuesto o material que es capaz de eliminar un electrón de un compuesto que está siendo oxidado. A modo de ejemplo, agentes oxidantes incluyen, pero no se limitan a, glutatión oxidado, cistina, cistamina, ditiotreitól oxidado, eritreitol oxidado y oxígeno. Una amplia variedad de agentes oxidantes son apropiados para uso en los métodos y composiciones descritas en el presente documento.

[0100] El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a un material, incluyendo, pero no limitado, a una sal, vehículo o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades del compuesto, y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

[0101] El término "marcador de fotoafinidad," como se utiliza aquí, se refiere a una etiqueta con un grupo, el cual, tras la exposición a la luz, forma un enlace con una molécula para la que la etiqueta tiene una afinidad. A modo solamente de ejemplo, una unión de este tipo puede ser covalente o no covalente.

[0102] El término "resto fotoenjaulado", como se usa aquí, se refiere a un grupo que, después de la iluminación en ciertas longitudes de onda, se une covalentemente o no covalentemente a otros iones o moléculas.

[0103] El término "grupo fotoescindible," tal como se utiliza aquí, se refiere a un grupo que se rompe con la exposición a la luz.

[0104] El término "fotoentrecruzador", como se usa aquí, se refiere a un compuesto que comprende dos o más grupos funcionales que, tras la exposición a la luz, son reactivos y forman un enlace covalente o no covalente con dos o más moléculas monoméricas o poliméricas.

[0105] El término "resto fotoisomerizable," como se utiliza aquí, se refiere a un grupo en el que tras la iluminación con luz cambia de una forma isomérica a otra.

[0106] El término "polialquilenglicol", como se usa aquí, se refiere a polioles de poliéter poliméricos lineales o ramificados. Tales glicoles de polialquilenos, que incluyen, pero no están limitados a, polietilenglicol, polipropilenglicol, glicol de butileno, y sus derivados. Otras realizaciones de ejemplo se enumeran, por ejemplo, en catálogos de proveedores comerciales, tales como catálogo "polietilenglicol y derivados para aplicaciones biomédicas" de Shearwater Corporation (2001). A modo de único ejemplo, tales polioles de poliéter poliméricos tienen pesos moleculares medios entre aproximadamente 0,1 kDa a aproximadamente 100 kDa. A modo de ejemplo, tales polioles de poliéter poliméricos incluyen, pero no se limitan a, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero no limitado a, aproximadamente 100.000 Da, de 95000 Da, aproximadamente 90.000 Da, aproximadamente 85.000 Da, aproximadamente 80.000 Da, aproximadamente 75.000 Da, aproximadamente 70.000 Da, aproximadamente 65.000 Da, aproximadamente 60.000 Da, aproximadamente 55.000 Da, de aproximadamente 50.000 Da, aproximadamente 45.000 Da, de aproximadamente 40.000 Da, aproximadamente 35.000 Da, aproximadamente 30.000 Da, aproximadamente 25.000 Da, aproximadamente 20.000 Da, aproximadamente 15.000 Da, de aproximadamente 10.000 Da, aproximadamente 9000 Da, aproximadamente 8.000 Da, aproximadamente 7.000 Da, aproximadamente 6.000 Da, aproximadamente 5.000 Da, aproximadamente 4.000 Da, aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 2.000 Da, aproximadamente 1.000 Da, aproximadamente 900 Da, aproximadamente 800 Da, aproximadamente 700 Da, aproximadamente 600 Da, aproximadamente 500 Da, 400 Da, aproximadamente 300 Da, aproximadamente 200 Da, y aproximadamente 100 Da. En algunas realizaciones el peso molecular del polímero es entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 2.000 a aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas

realizaciones, la molécula de poli (etilenglicol) es un polímero ramificado. El peso molecular de la cadena ramificada de PEG puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero no limitado a, aproximadamente 100.000 Da, de 95000 Da, aproximadamente 90.000 Da, aproximadamente 85.000 Da, aproximadamente 80.000 Da, aproximadamente 75.000 Da, aproximadamente 70.000 Da, aproximadamente 65.000 Da, aproximadamente 60.000 Da, aproximadamente 55.000 Da, aproximadamente 50.000 Da, aproximadamente 45.000 Da, aproximadamente 40.000 Da, aproximadamente 35.000 Da, aproximadamente 30.000 Da, aproximadamente 25.000 Da, aproximadamente 20.000 Da, aproximadamente 15.000 Da, aproximadamente 10.000 Da, aproximadamente 9000 Da, aproximadamente 8.000 Da, aproximadamente 7.000 Da, aproximadamente 6.000 Da, aproximadamente 5.000 Da, aproximadamente 4.000 Da, aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 2.000 Da y aproximadamente 1.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular de la cadena de PEG ramificado es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular de la cadena de PEG ramificado es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular de la cadena de PEG ramificado es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular de la cadena ramificada de PEG es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da. En otras formas de realización, el peso molecular de la cadena ramificada de PEG es de entre aproximadamente 2.000 a aproximadamente 50.000 Da.

[0107] El término "polímero", como se usa aquí, se refiere a una molécula compuesta de subunidades repetidas. Tales moléculas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos, o polisacáridos o glicoles de polialquileño.

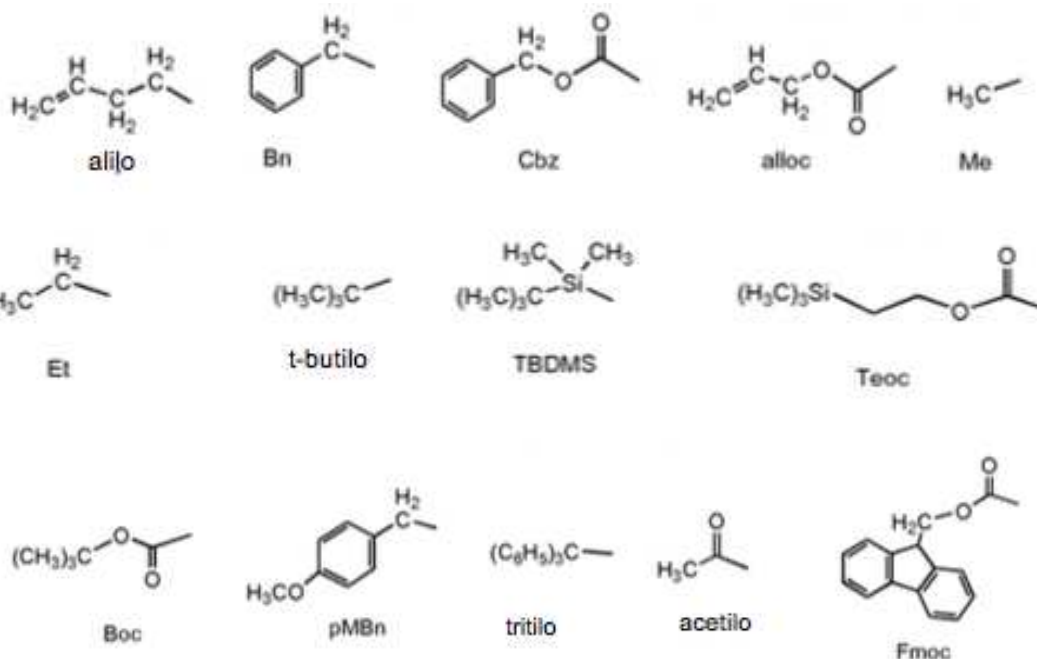
[0108] Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido que se aplica igualmente a la descripción de un péptido y una descripción de una proteína, y viceversa. Los términos se aplican a polímeros de origen natural de aminoácidos, así como polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido es un aminoácido no natural. Además, tales "polipéptidos", "péptidos" y "proteínas" incluyen cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en las que los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

[0109] El término "modificado después de la traducción" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural, que se produce después de tal aminoácido se ha incorporado en traslación en una cadena polipeptídica. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificaciones in vivo co-traduccionales, modificaciones in vitro co-traduccionales (por ejemplo, en un sistema de traducción libre de células), después de la traducción en las modificaciones in vivo, y las modificaciones posteriores a la traducción in vitro.

[0110] El término "cantidad profilácticamente eficaz", como se usa aquí, se refiere esa cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácido no natural o al menos un polipéptido modificado de aminoácido no natural aplicado profilácticamente a un paciente que aliviará en cierto grado uno o más de los síntomas de una enfermedad, afección o trastorno que está siendo tratado. En tales aplicaciones profilácticas, tales cantidades pueden depender del estado de salud del paciente, peso, y similares. Se considera incluida dentro de la experiencia de la técnica la determinación de tales cantidades profilácticamente eficaces por experimentación rutinaria, incluyendo, pero no limitado a, un ensayo clínico de escalada de dosis.

[0111] El término "protegido", como se usa aquí, se refiere a la presencia de un "grupo protector" o resto que impide la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en determinadas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se protege. A modo solamente de ejemplo, (i) si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector se puede seleccionar de terc-butiloxicarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc); (ii) si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfida; y (iii) si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo tal como metilo, etilo, o terc-butilo.

[0112] A modo solamente de ejemplo, los grupos de bloqueo/protectores pueden seleccionarse de:



[0113] Además, los grupos protectores incluyen, pero no se limitan a, incluidos los grupos fotolábiles como Nvoc y MeNvoc y otros grupos protectores conocidos en la técnica. Otros grupos protectores se describen en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1999.

[0114] El término "resto radiactivo," como se utiliza aquí, se refiere a un grupo cuyos núcleos espontáneamente emiten radiación nuclear, tal como alfa, beta, gamma o partículas; en donde, las partículas alfa son núcleos de helio, partículas beta son electrones y partículas gamma son fotones de alta energía.

[0115] El término "compuesto reactivo", como se usa aquí, se refiere a un compuesto que en condiciones apropiadas es reactivo frente a otro átomo, molécula o compuesto.

[0116] El término "célula huésped recombinante", también se refiere como "célula huésped" se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, en el que los métodos usados para insertar el polinucleótido exógeno en una célula incluyen, pero no se limitan a, absorción directa, transducción, f-apareamiento, u otros métodos conocidos en la técnica para crear células huésped recombinantes. A modo solamente de ejemplo, tal polinucleótido exógeno puede ser un vector no integrado, incluyendo, pero no limitado a, un plásmido, o puede estar integrado en el genoma de huésped.

[0117] El término "agente redox-activo", como se usa aquí, se refiere a una molécula que se oxida o reduce otra molécula, por lo que el agente activo redox se reduce o se oxida. Ejemplos de agente activo redox incluyen, pero no se limitan a, ferroceno, quinonas, complejos $Ru^{2+/3+}$, complejos $Co^{2+/3+}$, y complejos $OS^{2+/3+}$.

[0118] El término "agente reductor", como se usa aquí, se refiere a un compuesto o material que es capaz de añadir un electrón a un compuesto que está siendo reducido. A modo de ejemplo agentes reductores incluyen, pero no se limitan a, ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol, ditioeritritol, cisteína, cisteamina (2-aminoetanotiol), y glutatión reducido. Tales agentes reductores se pueden usar, solamente a modo de ejemplo, para mantener los grupos sulfhidrilo en el estado reducido y para reducir los enlaces disulfuro intra- o intermoleculares.

[0119] "Replegamiento," como se usa en el presente documento describe cualquier proceso, reacción o método que transforma un estado incorrectamente plegado o desplegado a una conformación nativa o correctamente plegada. A modo solamente de ejemplo, el replegamiento transforma el enlace disulfuro que contiene polipéptidos a partir de un estado incorrectamente plegado o desplegado a una conformación nativa o correctamente plegada con respecto a enlaces de disulfuro. Polipéptidos que contienen tales enlaces de disulfuro pueden ser polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales.

[0120] El término "resina", como se usa aquí, se refiere a peso molecular alto, perlas de polímero insolubles. A modo solamente de ejemplo, tales perlas se pueden usar como soportes para la síntesis de péptidos en fase sólida, o sitios para la unión de las moléculas antes de la purificación.

[0121] El término "sacárido", como se usa aquí, se refiere a una serie de carbohidratos, incluyendo pero no limitado a los azúcares, monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

[0122] El término "seguridad" o "perfil de seguridad", como se usa en el presente documento, se refiere a los efectos que podrían estar relacionados con la administración de un medicamento en relación con el número de veces que el fármaco ha sido administrado. A modo de ejemplo, un fármaco que se ha administrado muchas veces y sólo ha producido efectos secundarios leves o ausentes, se dice que tiene un excelente perfil de seguridad. Un ejemplo no limitante de un método para evaluar el perfil de seguridad se da en el ejemplo 26. Este método puede ser utilizado para evaluar el perfil de seguridad de cualquier polipéptido.

[0123] La frase "hibrida selectivamente con" o "hibrida específicamente con", como se usa aquí, se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja incluyendo, pero no limitado a, ADN o ARN celular o de biblioteca total.

[0124] El término "marcador de espín", como se usa aquí, se refiere a moléculas que contienen un átomo o un grupo de átomos que presentan un espín electrónico desapareado (es decir, un grupo paramagnético estable) que se puede detectar por espectroscopia de resonancia de espín de electrones y puede unirse a otra molécula. Dichas moléculas de giro de etiqueta incluyen, pero no se limitan a, radicales nitrilo y nitroxidos, y pueden ser etiquetas espín individuales o etiquetas espín dobles.

[0125] El término "estequiométrico", como se usa aquí, se refiere a la relación de los moles de los compuestos que participan en una reacción química siendo de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,1.

[0126] El término "de tipo estequiométrico," como se utiliza aquí, se refiere a una reacción química que convierte en estequiométrico o casi estequiométrico de los cambios en las condiciones de reacción o en presencia de aditivos. Tales cambios en las condiciones de reacción incluyen, pero no se limitan a, un aumento de temperatura o cambio de pH. Tales aditivos incluyen, pero no se limitan a, aceleradores.

[0127] La frase "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a la hibridación de secuencias de DNA, RNA, PNA u otros imitadores de ácidos nucleicos, o combinaciones de los mismos, en condiciones de baja fuerza iónica y alta temperatura. A modo de ejemplo, en condiciones rigurosas de una sonda se hibridará con su subsecuencia diana en una mezcla compleja de ácido nucleico (incluyendo pero no limitado a, ADN o RNA celular o de la biblioteca, total), pero no se hibrida con otras secuencias en la mezcla compleja. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. A modo de ejemplo, las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero no se limitan a, (i) aproximadamente 5 a 10°C más bajo que el punto de fusión térmico (Tm) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos; (ii) la concentración de sal es de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 1,0 M a aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (incluyendo pero no limitado a, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (incluyendo, pero no limitado a, mayores de 50 nucleótidos); (iii) la adición de agentes desestabilizantes, incluyendo, pero no limitado a, formamida, (iv) 50% de formamida, 5X SSC, y 1% de SDS, incubando a 42°C, o 5X SSC, aproximadamente 1% de SDS, incubando a 65°C, con lavado en 0,2 X SSC, y aproximadamente 0,1% de SDS a 65°C durante entre aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 120 minutos. A modo solamente de ejemplo, la detección de la hibridación selectiva o específica, incluye, pero no se limita a, una señal positiva al menos dos veces el fondo. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993).

[0128] El término "sujeto" como se usa en el presente documento, se refiere a un animal que es el objeto de tratamiento, observación o experimento. A modo solamente de ejemplo, un sujeto puede ser, pero no se limita a, un mamífero, incluyendo, pero no limitado a, un ser humano.

[0129] El término "sustancialmente purificado", como se usa aquí, se refiere a un componente de interés que puede ser sustancial o esencialmente libre de otros componentes que normalmente acompañan o interaccionan con el componente de interés antes de la purificación. A modo solamente de ejemplo, un componente de interés puede ser "sustancialmente purificado" cuando la preparación del componente de interés contiene menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, o menos de aproximadamente 1% (en peso seco) de componentes contaminantes. Por lo tanto, un componente "sustancialmente purificado" de interés puede tener un nivel de pureza de aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99% o mayor. A modo solamente de ejemplo, un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácidos no naturales se pueden purificar a partir de una célula nativa, o célula huésped en el caso de polipéptidos de aminoácidos naturales producidos de forma recombinante o polipéptidos de aminoácidos no

naturales. A modo de ejemplo, una preparación de un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácidos no naturales puede ser "sustancialmente purificado" cuando la preparación contiene menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, o menos de aproximadamente 1% (en peso seco) de material contaminante. A modo de ejemplo, cuando un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácidos no naturales se produce recombinantemente por las células huésped, el polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácidos no naturales pueden ser presentes en aproximadamente 30%, aproximadamente 25%, aproximadamente 20%, aproximadamente 15%, aproximadamente 10%, aproximadamente 5%, aproximadamente 4%, aproximadamente 3%, aproximadamente 2%, o aproximadamente 1% o menos del peso seco de las células. A modo de ejemplo, cuando un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural se produce recombinantemente por las células huésped, el polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácidos no natural pueden estar presentes en el medio de cultivo a aproximadamente 5 g/L, aproximadamente 4 g/L, aproximadamente 3 g/L, aproximadamente 2 g/L, aproximadamente 1 g/L, aproximadamente 750 mg/L, aproximadamente 500 mg/L, aproximadamente 250 mg/L, aproximadamente 100 mg/L, aproximadamente 50 mg/L, aproximadamente 10 mg/L, o aproximadamente 1 mg/L o menos del peso seco de las células. A modo de ejemplo, polipéptidos de aminoácidos naturales "sustancialmente purificados" o polipéptidos de aminoácidos no naturales pueden tener un nivel de pureza de aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 99% o mayor tal como se determina por métodos adecuados, incluyendo, pero no limitado a, el análisis por SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC, y la electroforesis capilar.

[0130] El término "sustituyentes" también se conoce como "sustituyentes que no interfieren" "se refiere a grupos que pueden usarse para sustituir a otro grupo en una molécula. Tales grupos incluyen, pero no se limitan a, halo, C₁-C₁₀ alquilo, C₂-C₁₀ alqueno, C₂-C₁₀ alquino, C₁-C₁₀ alcoxi, C₅-C₁₂ aralquilo, C₃-C₁₂ cicloalquilo, C₄-C₁₂ cicloalqueno, fenilo, fenilo sustituido, toluolilo, xilenilo, bifenilo, C₂-C₁₂ alcoxialquilo, C₅-C₁₂ alcoxiarilo, C₅-C₁₂ ariloxialquilo, C₇-C₁₂ oxiarilo, C₁-C₆ alquilsulfonilo, C₁-C₁₀ alquilsulfonilo, -(CH₂)_m-O-(C₁-C₁₀ alquilo) en la que m es de 1 a 8, arilo, arilo sustituido, alcoxi sustituido, fluoroalquilo, radical heterocíclico, heterocíclico sustituido radical, nitroalquilo, -NO₂, -CN, -NRC(O)-(C₁-C₁₀ alquilo), -C(O)-(C₁-C₁₀ alquilo), C₂-C₁₀ alctioalquilo, -C(O)O-(C₁-C₁₀ alquilo), -OH, -SO₂, =S, -COOH, -NR₂, carbonilo, -C(O)-(C₁-C₁₀ alquilo)-CF₃, -C(O)-CF₃, -C(O)NR₂, -(C₁-C₁₀ arilo)-S-(C₆-C₁₀ arilo), -C(O)-(C₆-C₁₀ arilo), -(CH₂)_m-O-(CH₂)_m-O-(C₁-C₁₀ alquilo) en el que cada m es de 1 a 8, -C(O)NR₂, -C(S)NR₂, -SO₂ NR₂, -NRC(O)NR₂, -NRC(S)NR₂, sales de los mismos, y similares. Cada grupo R en la lista anterior incluye, pero no se limita a, H, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, o alcarilo. Donde los grupos sustituyentes se especifican mediante sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, que abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda; por ejemplo, -CH₂O-es equivalente a -OCH₂-.

[0131] A modo solamente de ejemplo, los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos referidos como alquilenilo, alqueno, heteroalquilenilo, heteroalqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno, y heterocicloalqueno) incluye, pero no se limita a: -OR, =O, =NR, =N-OR, -NR₂, -RS, -halógeno, -SiR₃, -OC(O)R, -C(O)R, -CO₂R, -CONR₂, -OC(O)NR₂, -NRC(O)R, -NRC(O)NR₂, -NR(O)₂R, -NR-C(NR₂)=NR, -S(O)R, -S(O)₂R, -S(O)₂NR₂, -NRSO₂R, -CN y -NO₂. Cada grupo R en la lista anterior incluye, pero no se limita a, hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, incluyendo pero no limitado a, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi o grupos tioalcoxi, o grupos aralquilo. Cuando dos grupos R están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6, o 7 miembros. Por ejemplo, -NR₂ está destinado a incluir, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo.

[0132] A modo de ejemplo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, -OR, =O, =NR, =N-OR, -NR₂, -RS, -halógeno, -SiR₃, -OC(O)R, -C(O)R, -CO₂R, -CONR₂, -OC(O)NR₂, -NRC(O)R, -NRC(O)NR₂, -NR(O)₂R, -NR-C(NR₂)=NR, -S(O)R, -S(O)₂R, -S(O)₂NR₂, -NRSO₂R, -CN, -NO₂, -R, -N₃, -CH(Ph)₂, fluoro(C₁-C₄) alcoxi, y fluoro (C₁-C₄)alquilo, en un número que va de cero al número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde cada grupo R en la lista anterior incluye, pero no se limita a, hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo y heteroarilo.

[0133] El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa aquí, se refiere a la cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácidos no naturales y/o al menos un polipéptido modificado de aminoácido no natural administrado a un paciente que ya padece una enfermedad, afección o trastorno, suficiente para curar o al menos detener parcialmente o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que se trata. La eficacia de tales composiciones dependen de condiciones incluyendo, pero no limitado a, la gravedad y curso de la enfermedad, trastorno o afección, la terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos, y el juicio del médico tratante. A modo solamente de ejemplo, cantidades terapéuticamente eficaces se pueden determinar por experimentación de rutina, incluyendo, pero no limitado a un ensayo clínico de escalada de dosis.

[0134] El término "tioalcoxi", como se usa aquí, se refiere a grupos que contienen azufre alquilo unido a las moléculas a través de un átomo de oxígeno.

[0135] El término "punto de fusión térmico" o T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH, y concentración de ácido nucleico) a la que 50% de las sondas complementarias a una diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio.

[0136] El término "resto tóxico" o "grupo tóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a un que puede causar daños, disturbios, o la muerte. Restos tóxicos incluyen, pero no se limitan a, auristatina, agente de unión de surco menor de ADN, agente alquilante de surco menor del ADN, enedina, lexitropsina, duocarmicina, taxano, puromicina, dolastatina, maitansinoide, alcaloide de la vinca, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecano, morfolino-doxorubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, equinomicina, combretastatina, caliqueamicina, maitansina, DM-1, netropsina, podofilotoxina (por ejemplo, etopósido, tenipósido, etc.), bacatina y sus derivados, agentes anti-tubulina, criptofisina, combretastatina, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, epotilona A, epotilona B, nocodazol, colchicina, colcimida, estramustina, cemaotina, discodermolida, maitansina, eleuterobina, mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, clorozotocina, mostaza de uracilo, clormetina, ifosfamida, clorambucilo, pipobromán, trietilenmelamina, trietilenetiofosforamina, busulfán, dacarbazina, temozolomida y, itarabina, arabinósido de citosina, fluorouracilo, floxuridina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, pentostatina, 5-fluorouracilo, metotrexato, 10-propargilo-5,8-dideazafolato, 5,8-ácido dideazatetrahidrofólico, leucovorina, fosfato de fludarabina, pentostatina, gemcitabina, Ara-C, paclitaxel, docetaxel, deoxicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, azatioprina, brequinar, antibióticos (por ejemplo, antraciclinas, gentamicina, cefalotina, vancomicina, telavancina, daptomicina, azitromicina, eritromicina, rocitromicina, furazolidona, amoxicilina, ampicilina, carbenicilina, flucloxacilina, metilicina, penicilina, ciprofloxacina, moxifloxacina, ofloxacina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, estreptomina, rifabutina, etambutol, rifaximina, etc.), los medicamentos antivirales (por ejemplo, el abacavir, aciclovir, amplitigen, cidofovir, delavirdina, didanosina, efavirenz, entecavir, fosfonet, ganciclovir, ibacitabina, imunovir, idoxuridina, inosina, lopinavir, metisazona, nexavir, nevirapina, oseltamivir, penciclovir, estavudina, trifluridina, truvada, valaciclovir, zanamivir, etc.), daunorubicina clorhidrato, daunomicina, rubidomicina, cerubidina, idarubicina, doxorubicina, epirubicina y derivados, morfolino besciclopéptidos fenoxizona (por ejemplo, dactinomicina), glicopéptidos básicos (por ejemplo, bleomicina), glicósidos de antraquinona (por ejemplo, plicamicina, mitramicina), antracenodionas (por ejemplo, mitoxantrona), indoleidionas de aziridinopirrol (por ejemplo, mitomicina), inmunosupresores macrocíclicos (por ejemplo, ciclosporina, FK-506, tacrolimus, prograf, rapamicina, etc.), navelbena, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida, droloxafina, alocholchicina, halicondrina B, colchicina, derivados de colchicina, maitansina, rizoxina, paclitaxel, derivados de paclitaxel, docetaxel, tiocolchicina, cisterina de tritilo, sulfato de vincristina, sulfato de vincristina, cisplatino, carboplatino, hidroxiurea, N-metilhidrazina, epidofilotoxina, procarbazona, mitoxantrona, leucovorina y tegafur. "Los taxanos" incluyen paclitaxel, así como cualquier derivado de taxano activo o profármaco.

[0137] Los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento", como se usa aquí, incluyen aliviar, disminuir o mejorar una enfermedad o síntomas de condición, prevención de los síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad o condición, por ejemplo, el detenimiento del desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o condición, provocar la regresión de la enfermedad o condición, el alivio de una condición causada por la enfermedad o afección, o detener los síntomas de la enfermedad o condición. Los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento", incluyen, pero no se limitan a, profiláctico y/o tratamientos terapéuticos.

[0138] Tal como se utiliza aquí, el término "polímero soluble en agua" se refiere a cualquier polímero que es soluble en disolventes acuosos. Tales polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, propionaldehído de polietilenglicol, derivados mono C_{1-10} alcoxi o ariloxi de los mismos (que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.252.714), monometoxi-polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol de polivinilo, poliaminoácidos, diviniléter anhídrido maleico, N-(2-hidroxipropilo)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano, incluyendo sulfato de dextrano, polipropilenglicol, óxido de polipropileno/copolímero de óxido de etileno, poliol polioxielilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, derivados de oligosacáridos, glicanos, de celulosa y de celulosa, incluyendo pero no limitado a la metilcelulosa y carboximetilcelulosa, albúmina de suero, almidón y sus derivados, polipéptidos, polialquilenglicol y derivados de los mismos, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de los mismos, éteres de polivinilo etilo, y alfa-beta-poli [(2-hidroxietilo)-DL-aspartamida, y similares, o mezclas de los mismos. A modo solamente de ejemplo, el acoplamiento de tales polímeros solubles en agua a polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos no naturales puede resultar en cambios, incluyendo, pero no limitado a, el aumento de solubilidad en agua, el aumento o vida media en suero modulada, vida media terapéutica aumentada o modulada con respecto a la forma no modificada, el aumento de la biodisponibilidad, la actividad biológica modulada, el tiempo de circulación prolongada, inmunogenicidad modulada, características de asociación modulada física, incluyendo, pero no limitado a, la agregación y la formación de multímeros, unión al receptor alterado, unión alterada a una o más parejas de unión, y dimerización de receptor alterada o multimerización. Además, tales polímeros solubles en agua pueden o pueden no tener su propia actividad biológica.

[0139] A menos que se indique lo contrario, se emplean métodos convencionales de espectroscopia de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica.

[0140] Los compuestos, (incluyendo, pero no limitado a aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, y reactivos para la producción de los compuestos mencionados anteriormente) presentados en el presente documento incluyen compuestos etiquetados isotópicamente, que son idénticos a los citados en las diversas fórmulas y estructuras presentadas en este documento, salvo por el hecho de que uno o más átomos están reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico encontrado habitualmente en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en los presentes compuestos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , respectivamente. Ciertos compuestos isotópicamente etiquetados descritos en este documento, por ejemplo aquellos en los que los isótopos radiactivos tales como ^3H y ^{14}C se incorporan, son útiles en ensayos de distribución tisular de sustrato y/o drogas. Además, la sustitución con isótopos tales como deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo aumento en la vida media in vivo o reducción de los requerimientos de dosificación.

[0141] Algunos de los compuestos en el presente documento (incluyendo, pero no limitado a aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, y reactivos para la producción de los compuestos mencionados anteriormente) tienen átomos de carbono asimétricos y por lo tanto pueden existir como enantiómeros o diastereómeros. Las mezclas diastereoméricas pueden separarse en sus diastereómeros individuales sobre la base de sus diferencias fisicoquímicas por métodos conocidos, por ejemplo, mediante cromatografía y/o cristalización fraccionada. Los enantiómeros se pueden separar convirtiendo la mezcla enantiomérica en una mezcla diastereomérica por reacción con un compuesto ópticamente activo apropiado (por ejemplo, alcohol), separando los diastereómeros y convirtiendo (por ejemplo, hidrolizando) los diastereómeros individuales en los enantiómeros puros correspondientes. Todos estos isómeros, incluyendo diastereómeros, enantiómeros y mezclas de los mismos se consideran como parte de las composiciones descritas en el presente documento.

[0142] Los compuestos descritos en el presente documento ((incluyendo, pero no limitado a aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, y los reactivos para la producción de los compuestos mencionados anteriormente) se metabolizan tras la administración a un organismo en necesidad de producir un metabolito que se utiliza después para producir un efecto deseado, incluyendo un efecto terapéutico deseado.

[0143] Los métodos y formulaciones descritas en este documento incluyen el uso de N-óxidos, formas cristalinas (también conocidas como polimorfos), o sales farmacéuticamente aceptables de los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados. En ciertas realizaciones, los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados pueden existir como tautómeros. Todos los tautómeros se incluyen dentro del alcance de los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados presentados en este documento. Además, los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados descritos en este documento pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol, y similares. También se consideran las formas solvatadas de los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados presentados en el presente documento que se describe en este documento.

[0144] Algunos de los compuestos del presente documento (incluyendo, pero no limitado a los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos modificados de aminoácidos no naturales y reactivos para la producción de los compuestos mencionados anteriormente) pueden existir en varias formas tautoméricas. Todas estas formas tautoméricas se consideran como parte de las composiciones descritas en el presente documento. También, por ejemplo todas las formas enol-ceto de los compuestos (incluyendo, pero no limitado a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y reactivos para la producción de los compuestos mencionados anteriormente) en el presente documento se consideran como parte de las composiciones descritas en el presente documento.

[0145] Algunos de los compuestos en el presente documento (incluyendo, pero no limitado a aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y reactivos para producir cualquiera de los compuestos anteriormente mencionados) son ácidos y pueden formar una sal con un cation farmacéuticamente aceptable. Algunos de los compuestos en el presente documento (incluyendo, pero no limitado a aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y reactivos para producir los compuestos mencionados) puede ser de base y, en consecuencia, se puede formar una sal con un anión farmacéuticamente aceptable. Todas estas sales, incluyendo las di-sales están dentro del alcance de las composiciones descritas en este documento y pueden

prepararse por métodos convencionales. Por ejemplo, las sales se pueden preparar poniendo en contacto las entidades ácidas y básicas, ya sea en un medio acuoso, no acuoso o parcialmente acuoso. Las sales se recuperan mediante el uso de al menos una de las técnicas siguientes: filtración, precipitación con un no disolvente seguido de filtración, evaporación del disolvente, o, en el caso de soluciones acuosas, liofilización.

[0146] Las sales farmacéuticamente aceptables de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en este documento pueden formarse cuando un protón ácido presente en los polipéptidos de aminoácidos no naturales parentales es reemplazado por un ión metálico, a modo de ejemplo un ión de metal alcalino, un ion alcalinotérreo, o un ion de aluminio; o se coordina con una base orgánica. Además, las formas de sal de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos se pueden preparar usando sales de los materiales de partida o intermedios. Los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento pueden prepararse como una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable (que es un tipo de una sal farmacéuticamente aceptable) haciendo reaccionar la forma de base libre de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento con un ácido farmacéuticamente inorgánico u orgánico aceptable. Alternativamente, los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento se pueden preparar como sales de adición de base farmacéuticamente aceptable (que son un tipo de una sal farmacéuticamente aceptable) haciendo reaccionar la forma de ácido libre de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento con una base farmacéuticamente aceptable inorgánica u orgánica.

[0147] El tipo de sales farmacéuticas aceptables, incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de adición de ácidos, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, benzoico ácido, 3-(4-hidroxibenzoil) benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, 2-ácido naftalenosulfónico, 4-metilbencilo-[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, 4,4'-metilenbis-(3-hidroxi-2-eno-1 carboxílico), 3-ácido fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilo 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 original se reemplaza por un ion metálico, por ejemplo, un ión de metal alcalino, un ion alcalinotérreo, o un ion de aluminio; o se coordina con una base orgánica. Las bases orgánicas aceptables incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, y similares. Las bases inorgánicas aceptables incluyen hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, y similares.

[0148] Los contraiones correspondientes de las sales farmacéuticamente aceptables de polipéptidos de aminoácidos no naturales pueden analizarse e identificarse usando varios métodos incluyendo, pero no limitado a, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de iones, electroforesis capilar, plasma acoplado inductivamente, de absorción atómica de espectroscopía, espectrometría de masas, o cualquier combinación de los mismos. Además, la actividad terapéutica de tales sales farmacéuticamente aceptables de polipéptidos de aminoácidos no naturales puede ensayarse utilizando las técnicas y métodos descritos en los Ejemplos 87-91.

[0149] Debe entenderse que una referencia a una sal incluye las formas de adición o formas cristalinas de los mismos, en particular solvatos o polimorfos disolventes. Los solvatos contienen cantidades ya sea estequiométricas o no estequiométricas de un disolvente, y a menudo se forman durante el proceso de cristalización con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol, y similares. Los hidratos se forman cuando el disolvente es agua, o alcoholatos se forman cuando el disolvente es alcohol. Los polimorfos incluyen las diferentes disposiciones de cristal de embalaje de la misma composición elemental de un compuesto. Los polimorfos por lo general tienen diferentes patrones de difracción de rayos X, espectros infrarrojos, puntos de fusión, densidad, dureza, forma cristalina, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. Varios factores tales como el disolvente de recristalización, velocidad de cristalización, y la temperatura de almacenamiento pueden causar que domine una forma de cristal único.

[0150] La detección y caracterización de sales farmacéuticamente aceptables de polipéptidos de aminoácidos no naturales polimorfos y/o solvatos se puede realizar usando una variedad de técnicas, incluyendo, pero no limitado a, análisis térmico, difracción de rayos x, espectroscopia, sorción de vapor, y microscopía. Métodos de análisis térmico abordan degradación química térmica o procesos físicos térmicos, incluyendo, pero no limitado a, las transiciones polimórficas, y tales métodos se utilizan para analizar las relaciones entre formas polimórficas, determinar la pérdida de peso, para encontrar la temperatura de transición vítrea, o para estudios de compatibilidad excipiente. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, calorimetría diferencial de barrido (DSC), calorimetría de barrido diferencial modulada (MDC), análisis termogravimétrico (TGA), y análisis termogravimétrico y de infrarrojos (TG/IR). Métodos de difracción de rayos X incluyen, pero no se limitan a, cristal único y difractómetros de polvo y de las fuentes de sincrotrón. Las diversas técnicas espectroscópicas utilizadas incluyen, pero no se limitan a, Raman, FTIR, UVIS, y RMN (estado líquido y sólido). Las diversas técnicas de microscopía incluyen, pero no se limitan a, microscopía de luz polarizada, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) con análisis de rayos X dispersivo de energía (EDX), microscopía electrónica de barrido ambiental con EDX (en atmósfera de vapor de agua o gas), microscopía IR y

microscopía Raman.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 **[0151]** Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

- 10 La Figura 1 presenta una ilustración gráfica de unión Her-Tox al receptor Her2.
 La Figura 2 presenta una ilustración gráfica de la expresión de las variantes anti-Her2 determinadas por análisis ELISA.
 La Figura 3 presenta una ilustración gráfica de la expresión de las variantes anti-Her2 determinadas por análisis ELISA.
- 15 La Figura 4 presenta una ilustración gráfica del ensayo de proliferación celular con línea celular de cáncer de mama de HCC 1954 y derivados del enlazador de dolastatina.
 La Figura 5 presenta una ilustración gráfica del análisis del ensayo de proliferación celular con línea celular de cáncer de mama de HCC 1954 y conjugados de trastuzumab-Tox.
 La Figura 6 presenta una ilustración gráfica del análisis del ensayo de proliferación celular con línea celular de
- 20 cáncer de ovario de SKOV-3 y derivados de enlazador de dolastatina.
 La Figura 7 presenta una ilustración gráfica del análisis del ensayo de proliferación celular con línea celular de cáncer de ovario de SKOV-3 y conjugados de trastuzumab-Tox.
 La Figura 8 presenta una ilustración gráfica del análisis del ensayo de proliferación celular con línea celular de cáncer de mama de MDA-MB-468 y derivados de enlazador de dolastatina.
- 25 La Figura 9 presenta una ilustración gráfica del análisis del ensayo de proliferación celular con línea de cáncer de mama MDA-MB-468 y conjugados de trastuzumab-Tox.
 La Figura 10 presenta una ilustración gráfica de la medición del volumen del tumor (mm³) después de una sola dosis CI (3,3 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg) de los derivados de dolastatina vinculados a trastuzumab.
 La Figura 11 presenta formatos de ensayo utilizados para medir la concentración de derivados de dolastatina
- 30 vinculados a trastuzumab en suero de rata SD.
 La Figura 12 presenta ilustraciones gráficas de las concentraciones en suero (ng/ml) de derivados de dolastatina ligados a trastuzumab después de las inyecciones individuales IV.
 La Figura 13 presenta una ilustración gráfica de las concentraciones en suero (ng/ml) de derivados de dolastatina ligados a trastuzumab después de las inyecciones individuales IV. Este ensayo detecta la unión de anticuerpos al
- 35 receptor ErbB2.
 La Figura 14 presenta una ilustración gráfica de las concentraciones en suero (ng/ml) de los derivados de dolastatina ligados a trastuzumab después de la inyección IV. Las medidas de estabilidad in vivo detectan al menos dos derivados de dolastatina vinculados a rastuzumab.
 La Figura 15 presenta ilustraciones gráficas de la variación en el peso corporal de la rata y el volumen del tumor después del tratamiento con derivados de dolastatina vinculados a trastuzumab.
- 40 La Figura 16 presenta ilustraciones gráficas de la eficacia antitumoral de trastuzumab, Her2-HS122-NCD1 y Her2-HS122/LK145-HCD1 contra tumores establecidos de HCC1954 en ratones SCID-bg. A los ratones se les administró una sola inyección IV en el día 1 (flecha). Los puntos de datos representan volumen del tumor de promedio de grupo y barras de error representan el error estándar de la media (SEM).
- 45 La Figura 17 presenta ilustraciones gráficas de la eficacia antitumoral de los derivados de enlazador de dolastatina en MDA361DYT2 mama (2+) modelo de xenoinjerto.
 La Figura 18 presenta ilustraciones gráficas de la eficacia antitumoral de los derivados de enlazador de dolastatina en MDA361DYT2 mama (2+) modelo de xenoinjerto.

50 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0152] Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en el presente documento, será obvio para los expertos en la técnica que tales realizaciones se proporcionan a modo solamente de ejemplo. Numerosas variaciones, cambios y sustituciones se les ocurrirán a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Debe entenderse que diversas alternativas a las formas de realización de la invención descrita en este documento se pueden emplear en la práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos por el mismo.

60 I. Introducción

[0153] Recientemente, se ha informado de una nueva tecnología en las ciencias de la proteína, lo cual promete superar muchas de las limitaciones asociadas con modificaciones específicas de sitio de las proteínas. Específicamente, nuevos componentes se han añadido a la maquinaria biosintética de la proteína procariota *Escherichia coli* (*E. coli*) (por ejemplo, L. Wang, et al, (2001), Ciencia 292: 498-500) y la eucariota *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (por ejemplo, J. Chin et al, Science 301: 964-7 (2003)), que ha permitido la incorporación

de aminoácidos no naturales a las proteínas *in vivo*. Una serie de nuevos aminoácidos con propiedades novedosas, físicas o químicas y biológicas, incluyendo etiquetas de fotoafinidad y aminoácidos fotoisomerizables, aminoácidos cetona, y aminoácidos glicosilados se han incorporado de manera eficiente y con alta fidelidad en proteínas en *E. coli* y en la levadura en respuesta al codón ámbar, TAG, usando esta metodología. Los estudios han demostrado que es posible introducir selectivamente y de manera rutinaria los grupos químicos funcionales que no se encuentran en las proteínas, que son químicamente inertes a todos los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos comunes, codificados genéticamente y que se pueden usar para reaccionar de manera eficiente y selectiva para formar enlaces covalentes estables.

II. Visión de conjunto

[0154] En un nivel, se describe en el presente documento las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para la creación y el uso de derivados de enlazador de dolastatina o análogos que comprenden al menos un carbonilo, dicarbonilo, oxima, hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, azida, amidina, imina, diamina, ceto-amina, ceto-alquino, alquino, cicloalquino, o eno-diona. En otro nivel, se describe en el presente documento las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para la creación y el uso de derivados de enlazadores de dolastatina o análogos que comprenden al menos un aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado con una oxima, amina aromática, heterociclo (por ejemplo, indol, quinoxalina, fenazina, pirazol, triazol, etc.).

[0155] Tales derivados enlazadores de dolastatina que comprenden los aminoácidos no naturales pueden contener funcionalidad adicional, incluyendo, pero no limitado a, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos. Tenga en cuenta que las diversas funcionalidades mencionadas no pretenden dar a entender que los miembros de una funcionalidad no pueden clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, no habrá superposición dependiendo de las circunstancias particulares. A modo solamente de ejemplo, un polímero soluble en agua se solapa en su alcance con un derivado de polietilenglicol, sin embargo, el solapamiento no es completo y por lo tanto ambas funcionalidades se han citado anteriormente.

[0156] Proporcionado en este documento, en algunas realizaciones, es un derivado de grupo conector tóxico que comprende un carbonilo, dicarbonilo, oxima, hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, azida, amidina, imina, diamina, ceto-amina, ceto-alquino, alquino, cicloalquino, o eno-diona. En algunas formas de realización, el derivado de grupo tóxico comprende cualquiera de los enlazadores descritos en este documento. En otras formas de realización, se describe en el presente documento las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para la creación y el uso de derivados de grupos tóxicos o análogos que comprenden al menos un aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado con una oxima, amina aromática, heterociclo (por ejemplo, indol, quinoxalina, fenazina, pirazol, triazol, etc.).

[0157] En algunas realizaciones, tales derivados tóxicos que comprenden los aminoácidos no naturales pueden contener además funcionalidad, incluyendo, pero no limitado a, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos. En realizaciones específicas, el grupo tóxico es dolastatina o auristatina. En ciertas realizaciones específicas, el grupo tóxico es dolastatina-10. Tenga en cuenta que las diversas funcionalidades antes mencionadas no pretenden dar a entender que los miembros de una funcionalidad no pueden clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, no habrá superposición dependiendo de las circunstancias particulares. A modo solamente de ejemplo, un polímero soluble en agua se solapa en su alcance con un derivado de polietilenglicol, sin embargo, el solapamiento no es completo y por lo tanto ambas funcionalidades se han citado anteriormente.

[0158] Ciertas realizaciones de la presente invención describen preparaciones de ciertos restos tóxicos con enlazadores que reducen la toxicidad de la fracción *in vivo* mientras que el resto tóxico retiene la actividad farmacológica. En algunas realizaciones, la toxicidad del grupo tóxico ligado, cuando se administra a un animal o humano, se reduce o elimina en comparación con el grupo libre de tóxicos o derivados de grupo de tóxicos que comprenden enlaces lábiles, al tiempo que conserva la actividad farmacológica. En algunas realizaciones, el aumento de las dosis del grupo de tóxicos ligado (por ejemplo, derivados de enlazadores de dolastatina, derivados de dolastatina enlazados a aminoácidos no naturales) se pueden administrar a animales o seres humanos con mayor seguridad. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de aminoácidos no naturales ligados a un resto tóxico (por ejemplo, derivado de dolastatina) proporciona estabilidad *in vitro* e *in vivo*. En algunas realizaciones, los polipéptidos de aminoácidos no naturales ligados a un resto tóxico (por ejemplo, derivado de dolastatina-10) son eficaces y menos tóxicos en comparación con el resto tóxico libre (por ejemplo, dolastatina-10).

III. Derivados enlazadores de dolastatina

[0159] En un nivel, que se describe en el presente documento son las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para la creación y el uso de un derivado enlazador de dolastatina o análogos que comprende al menos un aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado con un grupo de carbonilo, dicarbonilo, oxima o

hidroxilamina. Tales derivados enlazadores de dolastatina que comprenden los aminoácidos no naturales pueden contener además funcionalidad, incluyendo, pero no limitado a, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos. Tenga en cuenta que las diversas funcionalidades antes mencionadas no pretenden dar a entender que los miembros de una funcionalidad no pueden clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, no habrá superposición dependiendo de las circunstancias particulares. A modo solamente de ejemplo, un polímero soluble en agua se solapa en su alcance con un derivado de polietilenglicol, sin embargo, el solapamiento no es completo y por lo tanto ambas funcionalidades se han citado anteriormente.

[0160] En un aspecto son los métodos para la selección y el diseño de un derivado enlazador de dolastatina que se modifica usando los métodos, composiciones y técnicas descritas en el presente documento. El nuevo derivado enlazador de dolastatina puede ser diseñado de novo, incluyendo a modo solamente de ejemplo, como parte del proceso de selección de alto rendimiento (en cuyo caso numerosos polipéptidos pueden ser diseñados, sintetizados, caracterizados y/o probados) o basados en los intereses del investigador. El nuevo derivado enlazador de dolastatina también puede ser diseñado en base a la estructura de un polipéptido conocido o parcialmente caracterizado. A modo solamente de ejemplo, dolastatina ha sido objeto de un intenso estudio realizado por la comunidad científica; un nuevo compuesto puede ser diseñado en base a la estructura de la dolastatina. Los principios para seleccionar qué aminoácido se sustituye y/o se modifica se describen en el presente documento por separado. La elección de qué modificaciones se emplean también se describe en el presente documento, y se puede utilizar para satisfacer la necesidad del usuario o experimentador final. Estas necesidades pueden incluir, pero no se limitan a, la manipulación de la eficacia terapéutica del polipéptido, mejorando el perfil de seguridad del polipéptido, el ajuste de la farmacocinética, farmacológica y/o la farmacodinamia del polipéptido, tales como, a modo solamente de ejemplo, el aumento de solubilidad en agua, biodisponibilidad, el aumento de la vida media sérica, aumentando la vida media terapéutica, la modulación de la inmunogenicidad, la modulación de la actividad biológica, o extender el tiempo de circulación. Además, tales modificaciones incluyen, sólo a modo de ejemplo, la provisión de una funcionalidad adicional para el polipéptido, la incorporación de un anticuerpo, y cualquier combinación de las modificaciones antes mencionadas.

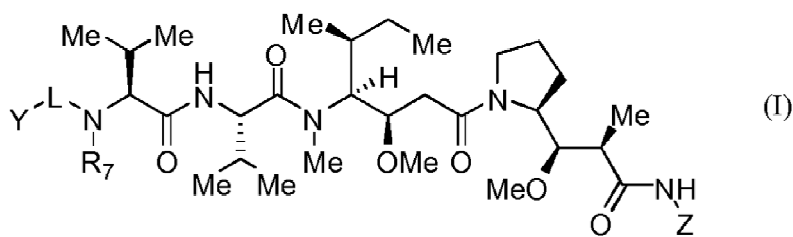
[0161] También se describe en la presente memoria derivados enlazadores de dolastatina que se han modificado o se pueden modificar para contener un grupo de oxima, carbonilo, dicarbonilo, o hidroxilamina. Se incluye con este aspecto métodos para producir, purificar, caracterizar y usar tales derivados enlazadores de dolastatina.

[0162] El derivado enlazador de dolastatina puede contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, o diez o más de un grupo carbonilo o dicarbonilo, grupo oxima, grupo hidroxilamina o formas protegidas de los mismos. El derivado enlazador de dolastatina puede ser igual o diferente, por ejemplo, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más sitios diferentes en el derivado que comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más grupos reactivos diferentes.

A. Estructura y síntesis de derivados enlazadores de dolastatina: Grupos electrofílicos y nucleofílicos

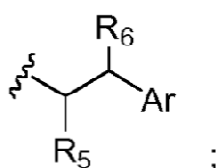
[0163] Derivados de dolastatina con enlazadores que contienen un grupo hidroxilamina (también llamada un aminooxi) permite la reacción con una variedad de grupos electrófilos para formar conjugados (incluyendo pero no limitado a, con PEG u otros polímeros solubles en agua). Como hidrazinas, hidrazidas y semicarbazidas, la nucleofilicidad mejorada del grupo aminooxi lo permite reaccionar de manera eficiente y selectiva con una variedad de moléculas que contienen grupos de carbonilo o dicarbonilo, incluyendo pero no limitado a, cetonas, aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Mientras que el resultado de la reacción con un grupo hidrazina es la hidrazona correspondiente, sin embargo, se produce un oxima generalmente de la reacción de un grupo aminooxi con un grupo carbonilo o dicarbonilo que contiene, tal como, a modo de ejemplo, grupos de cetonas, aldehídos u otros grupos funcionales con una reactividad química similar. En algunas realizaciones, derivados de dolastatina con enlazadores que comprenden una azida, alquino o cicloalquino permiten vincular moléculas a través de reacciones de cicloadición (por ejemplo, cicloadiciones 1,3-dipolares, cicloadición de azida-alquino Huisgen, etc.)

[0164] Por lo tanto, en ciertas realizaciones descritas en el presente documento son derivados de dolastatina con enlazadores que comprenden una hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, amidina, imina, diamina, ceto-amina, ceto-alquino, y el grupo hidroxilamina eno-diona, un grupo similar a hidroxilamina (que tiene una reactividad similar a un grupo de hidroxilamina y es estructuralmente similar a un grupo hidroxilamina), un grupo hidroxilamina enmascarado (que se puede convertir fácilmente en un grupo hidroxilamina), o un grupo de hidroxilamina protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo de hidroxilamina, tras la desprotección). En algunas revelaciones, los derivados de dolastatina con enlazadores comprenden azidas, alquinos o cicloalquinos. La presente invención proporciona compuestos que tienen la estructura de Fórmula (I):



en la que:

Z tiene la estructura de:



R₅ es H, COR₈ C₁-C₆ alquilo, ortiazol;
R₈ es OH;
R₆ es OH o H;
Ar es fenilo o piridina;
R₇ es C₁-C₆ alquilo o hidrógeno;
Y es hidroxilamina;
L es-alquilenos o -(alquilenos-O)_n-alquilenos-; y
n es un número entero mayor que 0 e igual a uno

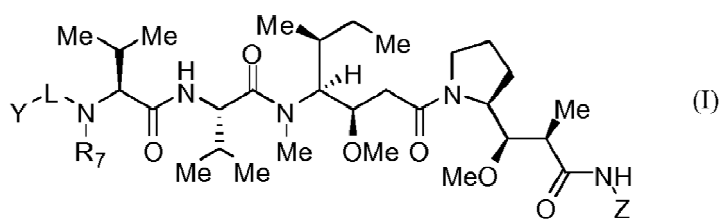
Tales derivados enlazadores de dolastatina pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, después de la traducción modificada.

[0165] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₅ es el ácido tiazol o carboxílico. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₅ es hidrógeno en ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₅ es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, o hexilo.

[0166] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), cada alquileo es independientemente -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100.

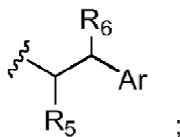
B. Estructura y síntesis de derivados enlazadores de dolastatina: Grupos de hidroxilamina

[0167] Por lo tanto los derivados de dolastatina de la invención tienen enlazadores que comprenden un grupo de hidroxilamina. Tales derivados enlazadores de dolastatina incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (I):



en la que:

Z tiene la estructura de:



R₅ es H, COR₈ C₁-C₆ alquilo, o tiazol;

R₈ es OH;

R₆ es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

R₇ es C₁-C₆ alquilo o hidrógeno;

Y es NH₂-O-;

L es-alquilenos o -(alquilenos-O)_n-alquilenos-; y

n es un número entero mayor que o igual a uno.

Tales derivados enlazadores de dolastatina pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, después de la traducción modificada.

[0168] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₅ es tiazol. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₅ es hidrógeno. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₅ es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, o hexilo.

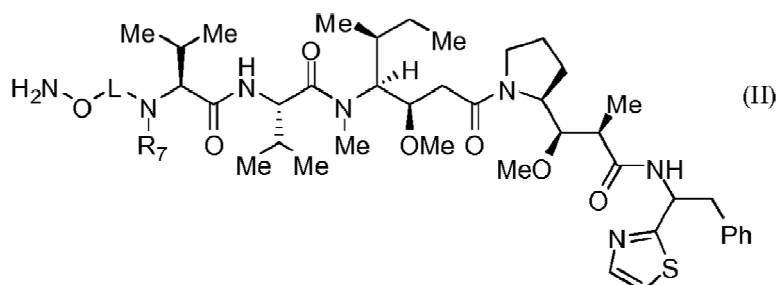
[0169] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₆ es H. En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₆ es hidroxilo.

[0170] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), Ar es fenilo.

[0171] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₇ es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo, o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₇ es hidrógeno.

[0172] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), alquilenos es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100.

[0173] En ciertas realizaciones, los derivados enlazadores de dolastatina incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (II):



En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), L es -(alquilenos-O)_n-alquilenos-. En algunas realizaciones,

cada alquileo es $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, n es igual a 3, y R_7 es metilo. En algunas formas de realización, L es - alquileo. En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), cada alquileo es $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ y R_7 es metilo o hidrógeno. Tales derivados enlazadores de dolastatina pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacional.

[0174] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), R_7 es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo iso-butilo, terc-butilo, pentilo, o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), R_7 es hidrógeno.

[0175] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), alquileo es $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100.

[0176] En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I) son estables durante al menos 2 semanas bajo condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, tales condiciones ácidas son pH 2 a 8.

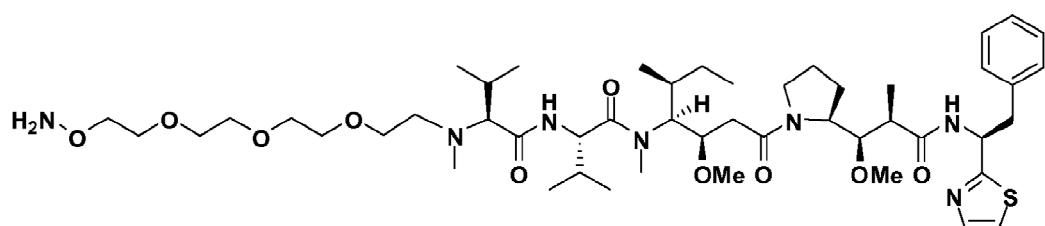
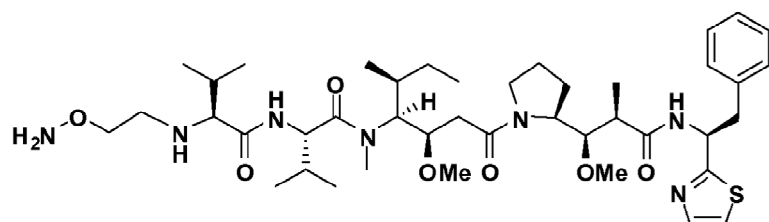
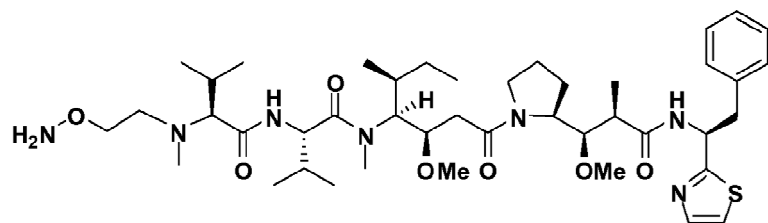
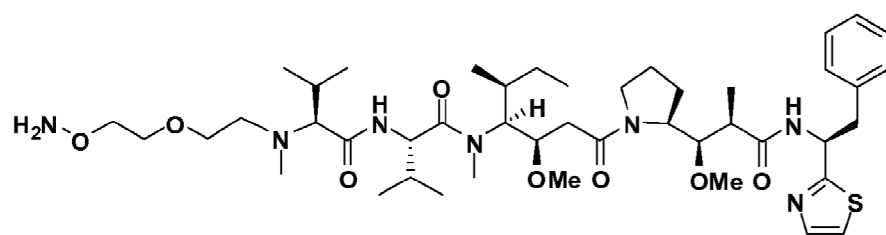
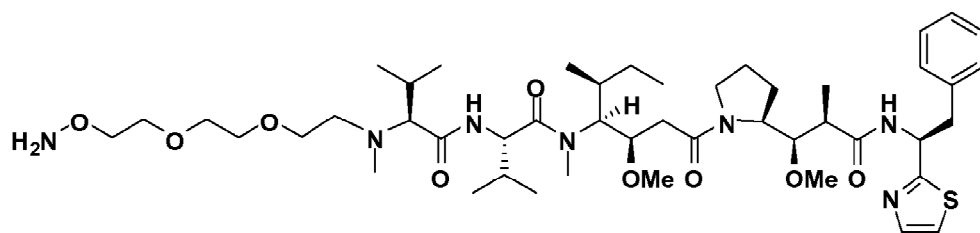
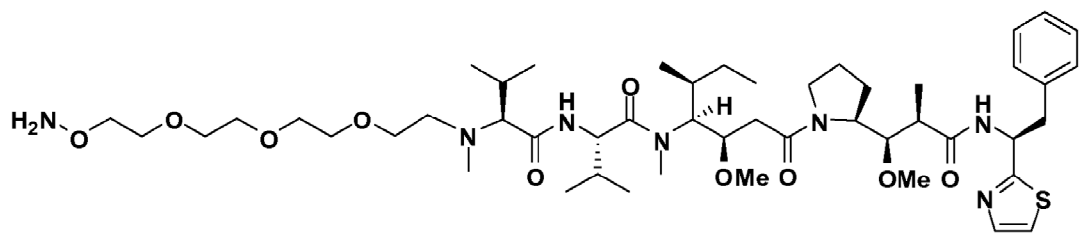
[0177] Los métodos y composiciones proporcionadas y descritas en este documento incluyen polipéptidos que comprenden derivado enlazador de dolastatina contienen al menos un grupo carbonilo o dicarbonilo, un grupo oxima, un grupo hidroxilamina, o formas protegidas o enmascaradas de los mismos. La introducción de al menos un grupo reactivo en un derivado enlazador de dolastatina puede permitir la aplicación de químicas de conjugación que implican reacciones químicas específicas, incluyendo, pero no limitado a, con uno o más derivado(s) enlazador(es) de dolastatina mientras que no reacciona con los aminoácidos comunes. Una vez que se incorpora, las cadenas laterales de derivados enlazadores de dolastatina también se pueden modificar mediante la utilización de metodologías de química descritas en este documento o adecuadas para los grupos funcionales particulares o sustituyentes presentes en el derivado enlazador de dolastatina.

[0178] Los métodos y composiciones derivados enlazadores de dolastatina descritos en la presente memoria proporcionan conjugados de sustancias que tienen una amplia variedad de grupos funcionales, sustituyentes o restos, con otras sustancias, incluyendo pero no limitado a un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos.

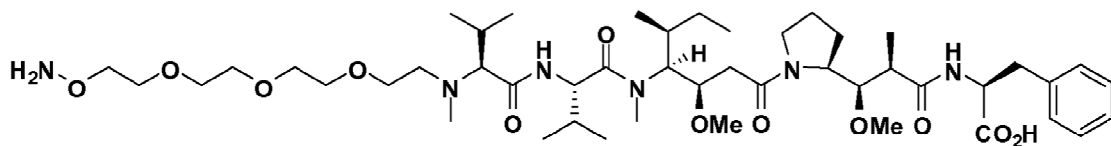
[0179] En ciertas realizaciones, los derivados enlazadores de dolastatina, enlazadores y reactivos descritos en el presente documento, incluyendo los compuestos de fórmulas (I) son estables en solución acuosa bajo condiciones ligeramente ácidas (incluyendo pero no limitado a pH 2 a 8). En otras formas de realización, tales compuestos son estables durante al menos un mes en condiciones ligeramente ácidas. En otras formas de realización, tales compuestos son estables durante al menos 2 semanas bajo condiciones ligeramente ácidas. En otras formas de realización, tales compuestos son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas.

[0180] En otro aspecto de las composiciones, procedimientos, técnicas y estrategias descritas en el presente documento son métodos para el estudio o el uso de cualquiera de los derivados enlazadores de dolastatina de aminoácidos no naturales "modificados o no modificados" antes mencionados. Se incluyen dentro de este aspecto, a modo solamente de ejemplo, son los usos terapéuticos, de diagnóstico, basados en ensayo, industriales, cosméticos, biológicos vegetales, de medio ambiente, de producción de energía, de productos de consumo, y/o militares que se beneficiarían de un derivado enlazador de dolastatina que comprende un polipéptido o proteína de aminoácido no natural "modificado o no modificado".

[0181] Los ejemplos no limitantes de derivados enlazadores de dolastatina incluyen:



y



IV. Derivados de aminoácidos no naturales

[0182] Los aminoácidos no naturales usados en los métodos y composiciones descritas en el presente documento tienen por lo menos una de las cuatro propiedades siguientes: (1) al menos un grupo funcional en la cadena lateral del aminoácido no natural tiene al menos una característica y/o actividad y/o reactividad ortogonal a la reactividad química de los 20 aminoácidos comunes, genéticamente codificados (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), o al menos ortogonal a la reactividad química de los aminoácidos de origen natural presentes en el polipéptido que incluye el aminoácido no natural; (2) los aminoácidos introducidos no naturales son sustancialmente químicamente inertes frente a los 20 aminoácidos comunes, genéticamente codificados; (3) el aminoácido no natural se puede incorporar de forma estable en un polipéptido, preferiblemente con la estabilidad en consonancia con los aminoácidos de origen natural o en condiciones fisiológicas típicas, y aún más preferiblemente tal incorporación puede producirse a través de un sistema *in vivo*; y (4) el aminoácido no natural incluye un grupo funcional oxima o un grupo funcional que puede ser transformado en un grupo oxima por reacción con un reactivo, preferiblemente en condiciones que no destruyen las propiedades biológicas del polipéptido que incluye un aminoácido no natural (a menos que, por supuesto, tal destrucción de las propiedades biológicas de este tipo es el propósito de la modificación/transformación), o cuando la transformación se puede producir en condiciones acuosas a un pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8, o cuando el sitio reactivo en el aminoácido no natural es un sitio electrofílico. Cualquier número de aminoácidos no naturales se puede introducir en el polipéptido. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir grupos enmascarados que se pueden transformar en un grupo oxima después de la desprotección del grupo protegido o desenmascaramiento del grupo enmascarado. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir grupos de carbonilo o dicarbonilo, que se pueden transformar en un grupo carbonilo o dicarbonilo después de la desprotección del grupo protegido o desenmascaramiento del grupo enmascarado y por lo tanto están disponibles para reaccionar con hidroxilaminas o oximas para formar grupos oxima.

[0183] Los ácidos de aminoácidos no naturales que se pueden utilizar en los métodos y composiciones descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos que comprenden aminoácidos con grupos funcionales nuevos, aminoácidos que interactúan de forma covalente o no covalente con otras moléculas, aminoácidos glicosilados tales como una serina sustituida por azúcar, otros aminoácidos de clorhidratos modificados, aminoácidos ácidos, aminoácidos que contienen aldehído, aminoácidos que comprenden polietilenglicol o de otros poliéteres, aminoácidos sustituidos por átomos pesados, aminoácidos químicamente escindibles y/o fotoescindibles, aminoácidos con cadenas laterales alargadas en comparación con aminoácidos naturales, incluyendo, pero no limitado a, poliéteres o hidrocarburos de cadena larga, incluyendo, pero no limitado a, más de aproximadamente 5 o más de aproximadamente 10 átomos de carbono, aminoácidos que contienen azúcar enlazado con carbono, aminoácidos con actividad redox, aminoácidos que contienen amino tioácido, y aminoácidos que comprenden uno o más restos tóxicos.

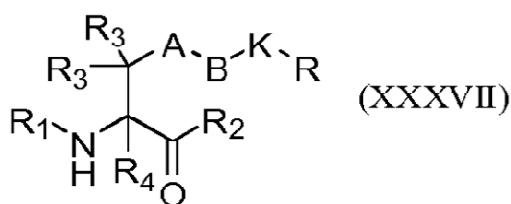
[0184] En algunas realizaciones, los aminoácidos no naturales comprenden un resto de sacárido. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen *N*-acetilo-L-glucosaminilo-L-serina, *N*-acetilo-L-galactosaminilo-L-serina, *N*-acetilo-L-glucosaminilo-L-treonina, *N*-acetilo-L-glucosaminilo-L-asparagina y *O*-manosaminilo-L-serina. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen también ejemplos donde los enlaces *N*- o *O*- de origen natural entre el aminoácido y el sacárido es reemplazado por un enlace covalente que no se encuentra comúnmente en la naturaleza - incluyendo pero no limitado a, un alqueno, un oxima, un tioéter, una amida y similares. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen también sacáridos que no se encuentran comúnmente en las proteínas de origen natural tales como 2-desoxiglucosa, 2-desoxigalactosa y similares.

[0185] Los restos químicos incorporados en polipéptidos a través de la incorporación de aminoácidos no naturales en tales polipéptidos ofrecen una variedad de ventajas y manipulaciones de polipéptidos. Por ejemplo, la reactividad única de un grupo funcional de carbonilo o dicarbonilo (incluyendo un grupo funcional de ceto o aldehído) permite la modificación selectiva de proteínas con cualquiera de un número de hidrazina o reactivos que contienen hidroxilamina *in vivo* y *in vitro*. Un aminoácido no natural de átomo pesado, por ejemplo, puede ser útil para la eliminación de datos de la estructura de rayos x. La introducción específica de sitio de átomos pesados utilizando aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad en la elección de las posiciones de los

átomos pesados. Fotorreactivos aminoácidos no naturales (incluyendo pero no limitado a, los aminoácidos con benzofenona y arilazidas (incluyendo pero no limitado a, cadenas laterales fenilazidas)), por ejemplo, permiten la fotorreticulación de polipéptidos eficiente *in vivo* e *in vitro*. Los ejemplos de aminoácidos no naturales fotorreactivos incluyen, pero no se limitan a, p-azido-fenilalanina y p-benzoil-fenilalanina. El polipéptido con los aminoácidos no naturales fotorreactivos puede reticularse a voluntad por la excitación del grupo fotorreactivo, proporcionando control temporal. En un ejemplo no limitante, el grupo de metilo de un aminoácido no natural puede estar sustituido con un etiquetado isotópicamente, incluyendo, pero no limitado a, un grupo metilo, como una sonda de la estructura local y la dinámica, incluyendo pero no limitado a, con el uso de resonancia magnética nuclear y espectroscopia vibracional.

A. Estructura y síntesis de Derivados de aminoácidos no naturales: carbonilo, similar carbonilo, carbonilo enmascarado, y grupos de carbonilo protegidos

[0186] Los aminoácidos con un grupo reactivo electrofílico permiten una variedad de reacciones para unir moléculas a través de diversas reacciones químicas, incluyendo, pero no limitado a, reacciones de adición nucleófila. Tales grupos reactivos electrofílicos incluyen un grupo de carbonilo o dicarbonilo (incluyendo un grupo ceto o aldehído), un grupo similar a carbonilo o similar a dicarbonilo (que tiene una reactividad similar a un grupo de carbonilo o dicarbonilo y es estructuralmente similar a un grupo de carbonilo o dicarbonilo), un grupo de carbonilo enmascarado o dicarbonilo enmascarado (que se puede convertir fácilmente en un grupo carbonilo o dicarbonilo), o un grupo de carbonilo protegido o dicarbonilo protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo de carbonilo o dicarbonilo tras la desprotección). Tales aminoácidos usados en la presente invención incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXVII):

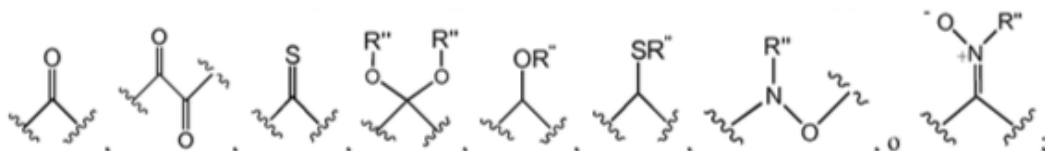


donde:

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

B es opcional y, cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo sustituido inferior, heteroalquileo, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k-, donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquileo o sustituido alquileo)-, -CSN(R')-, -CSN(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

K es



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

cada R'' es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, o un grupo protector, o cuando más de un grupo R'' está presente, dos R'' opcionalmente forman un heterocicloalquilo;

R₁ es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector;

cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ opcionalmente forman un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

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

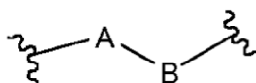
o el grupo -K-R juntos forman un cicloalquilo monocíclico o bicíclico o heterocicloalquilo que comprende al menos un grupo carbonilo, incluido un grupo dicarbonilo, grupo de carbonilo protegido, incluido un grupo de dicarbonilo protegido, o un grupo de carbonilo enmascarado, incluido un grupo de dicarbonilo enmascarado;

con la condición de que cuando A es fenileno y cada R₃ es H, B está presente; y de que cuando A es -(CH₂)₄ - y cada R₃ es H, B no es -NHC(O) (CH₂CH₂) -; y de que cuando A y B están ausentes y cada R₃ es H, R no es metilo. Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, después de la traducción modificada.

[0187] En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula (XXXVII) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula (XXXVII) son estables durante al menos 2 semanas bajo condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, el compuesto de fórmula (XXXVII) son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, tales condiciones ácidas son pH 2 a 8.

[0188] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), B es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(R')=N-N(R')-, -N(R')CO-, -C(O)-, -C(R')=N-, -C(O)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O) (alquileo o alquileo sustituido)-, o -S(O)₂ (alquileo o alquileo sustituido)-. En ciertas realizaciones de compuestos de fórmula (XXXVII), B es -O(CH₂)-, -CH=N-, -CH=N-NH-, -NHCH₂-, -NHCO-, -C(O)-, -C(O)-(CH₂)-, -CONH-(CH₂)-, -SCH₂-, -S(=O)CH₂-, o -S(O)₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R es C₁₋₆ alquilo o cicloalquilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII) R es -CH₃, -CH (CH₃)₂, o ciclopropilo. En ciertas realizaciones de compuestos de fórmula (XXXVII), R₁ es H, terc-butiloxycarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), N-acetilo, tetrafluoroacetilo (TFA), o benciloxycarbonilo (Cbz). En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₁ es una resina, aminoácido, polipéptido, anticuerpo, o polinucleótido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₂ es OH, O-metilo, O-etilo, o O-*t*-butilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₂ es una resina, aminoácido, polipéptido, anticuerpo, o polinucleótido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₂ es un polinucleótido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₂ es el ácido ribonucleico (ARN).

[0189] En ciertas realizaciones de compuestos de fórmula (XXXVII),



se selecciona del grupo que consiste en:

(i)

A es alquileo inferior sustituido, C₄-arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

B es opcional y, cuando está presente es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquienileno inferior, alquienileno inferior sustituido, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-, -C(O)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R'), -S(O)₂N(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)₂N(R')-, -N(R')N=, -C(R')=NN(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-;

(ii)

A es opcional y, cuando está presente está sustituido alquileo inferior, C₄-arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

B es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquienileno inferior, alquienileno inferior sustituido, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-, -C(O)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R'), -S(O)₂N(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)₂ N(R')-, -N(R')N=, -C(R')=NN(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-

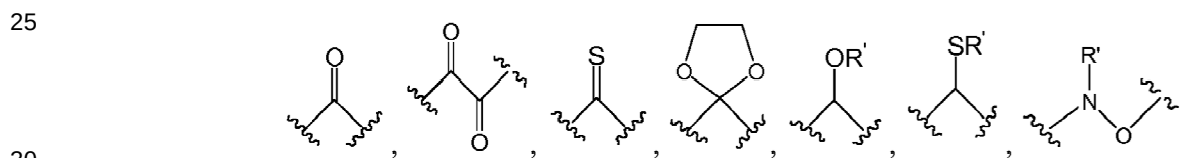
N(R')-;

(iii)

5 A es alquileo inferior;
B es opcional y, cuando está presente es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CSN(R')-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R'), -S(O)₂N(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)₂N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=NN(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-; y

(iv)

15 A es fenileno;
-S(O), -S-, - B es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)₂-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R'), -S(O)₂ N(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)₂N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=NN(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-; K es



0



cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

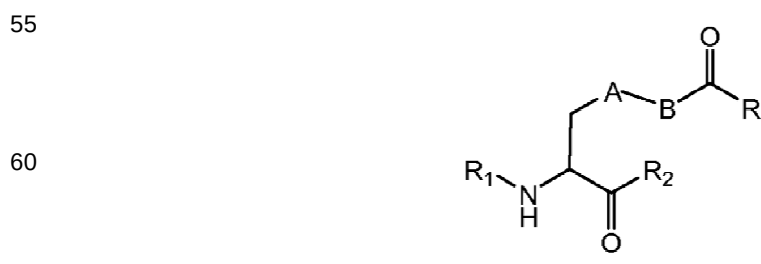
45 R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

50 cada R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido;

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

[0190] Además, los aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XXXVIII) se incluyen:



(XXXVIII),

65 donde:

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

B es opcional y, cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR' - (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=NN(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

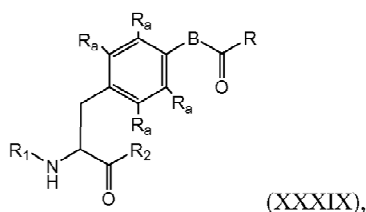
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es H, un grupo protector de amino, resina, al menos un aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es OH, un grupo protector de éster, resina, al menos un aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

con la condición de que cuando A es fenileno, B está presente; y de que cuando A es -(CH₂)₄-, B no es -NHC(O)(CH₂CH₂)-; y de que cuando A y B están ausentes, R no es metilo. Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificada postraslacionalmente.

[0191] Además, los aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XXXIX) se incluyen:



donde:

B es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo sustituido inferior, heteroalquileo, sustituido heteroalquileo inferior, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k-, donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR' - (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N- N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

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

R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector;

cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂-, -C(O)_kR', donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂-, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido. Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificada postraslacionalmente.

[0192] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



20

25

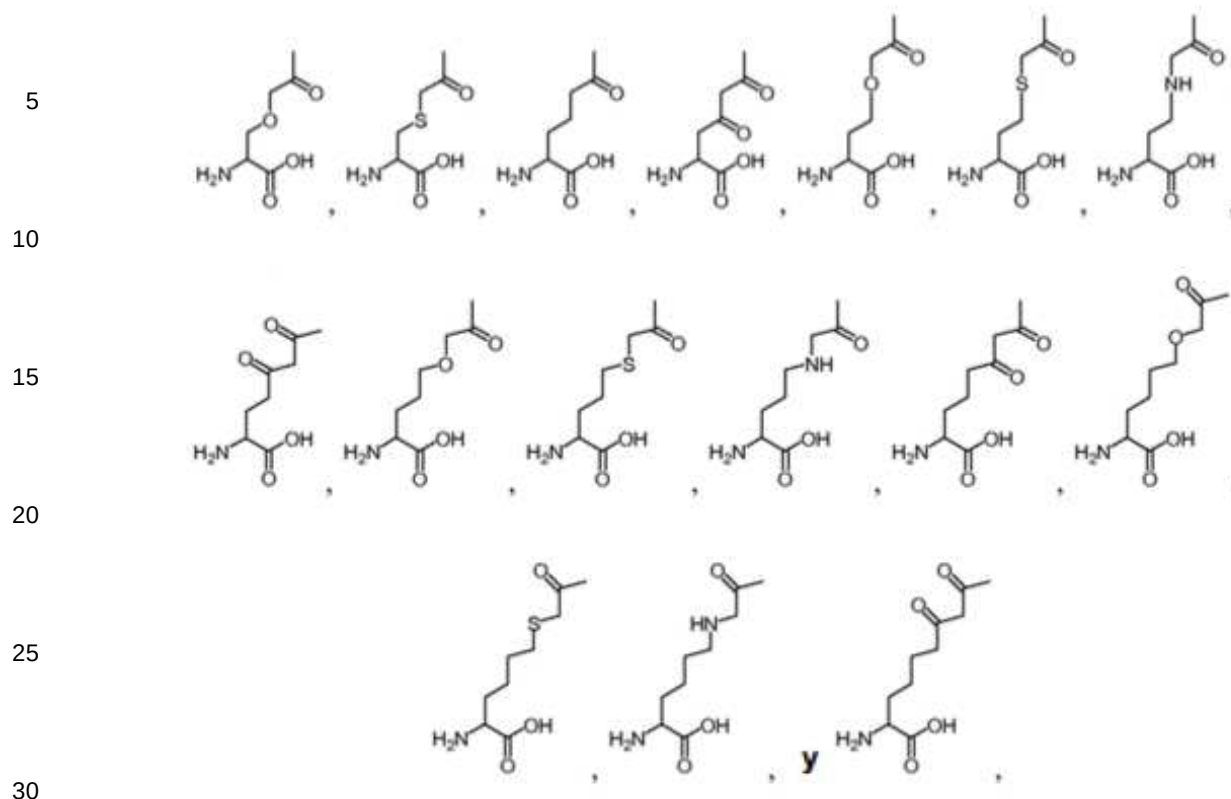


35

40

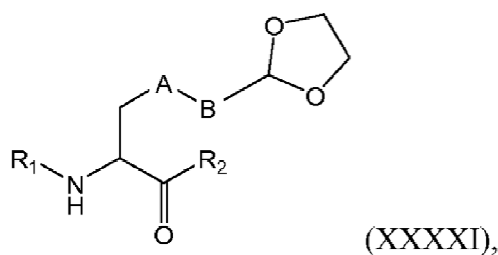
55

60



en el que dichos compuestos están opcionalmente amino protegidos, opcionalmente carboxilo protegido, opcionalmente amino protegido y carboxilo protegido, o una sal de los mismos, o puede incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente modificado postraslacionalmente.

[0195] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXI):



donde,

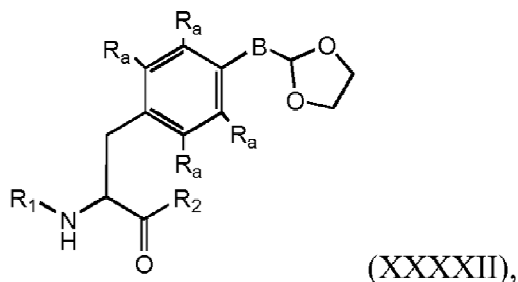
A es opcional y, cuando está presente es alquileo inferior, alquileo sustituido inferior, cicloalquileo, cicloalquileo sustituido inferior, alquilenilo, alquilenilo sustituido inferior, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo sustituido inferior, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno, aralquileo o aralquileo sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo sustituido inferior, alquilenilo, alquilenilo sustituido inferior, heteroalquileo, sustituido heteroalquileo inferior, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=NN(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde

cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido de protección.

- 5 Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, después de la traducción modificada.

[0196] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXII):



donde,

B es opcional y, cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno sustituido inferior, heteroalquileo, sustituido heteroalquileo inferior, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

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

R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

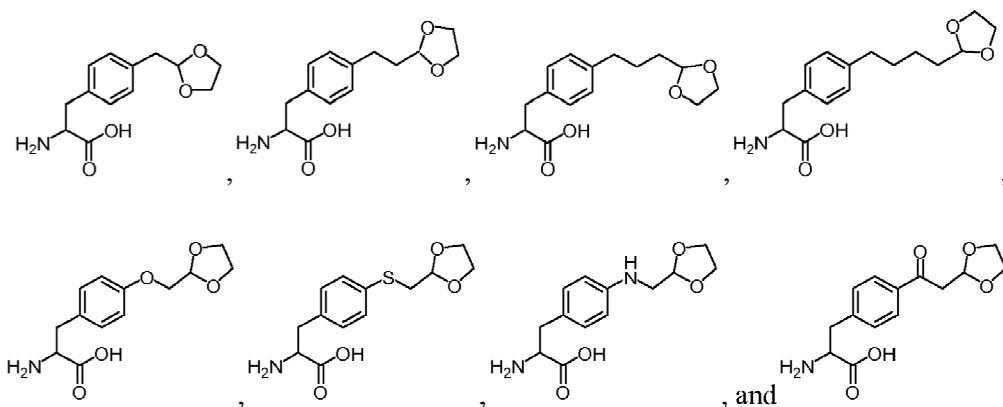
R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector;

en el que cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR', donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR',

donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

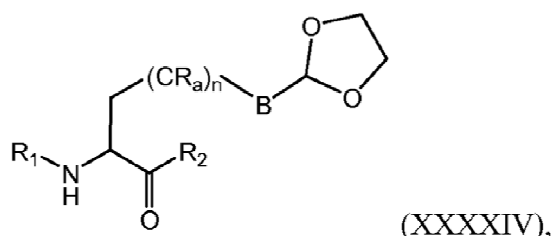
[0197] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



en el que dichos compuestos están opcionalmente amino protegidos, opcionalmente carboxilo protegidos,

opcionalmente amino protegidos y carboxilo protegido, o una sal del mismo, o puede incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

5 [0198] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXIV):



donde,

20 B es opcional y, cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo sustituido inferior, heteroalquileo, heteroalquileo sustituido inferior, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

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

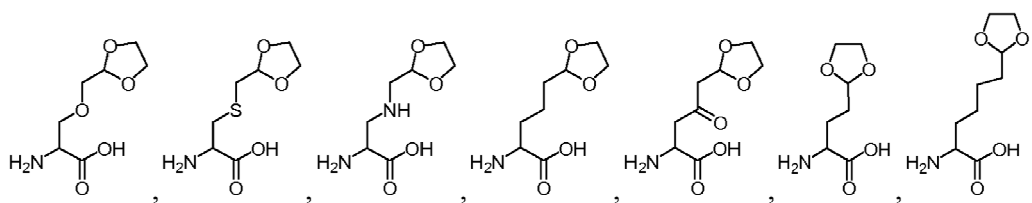
R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector;

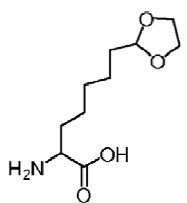
35 cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR', donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido; y n es 0 a 8.

40 Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0199] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



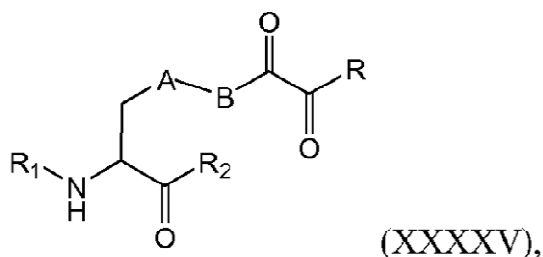
y



65 en el que dichos compuestos están opcionalmente amino protegidos, carboxilo opcionalmente protegido, amino opcionalmente protegido y carboxilo protegido, o una sal del mismo, o puede incorporarse en un polipéptido de

aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0200] Además de las estructuras de monocarbonilo, los aminoácidos no naturales descritos en el presente documento pueden incluir grupos tales como dicarbonilo, tipo dicarbonilo, dicarbonilo enmascarado y grupos de dicarbonilo protegidos. Por ejemplo, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XXXXV):



donde,

A es opcional y, cuando está presente es alquilenio inferior, alquilenio sustituido inferior, cicloalquilenio, cicloalquilenio sustituido inferior, alquenilenio, alquenilenio sustituido inferior, alquinilenio, heteroalquilenio inferior, heteroalquilenio sustituido, heterocicloalquilenio inferior, heterocicloalquilenio inferior sustituido, arilenio, arilenio sustituido, heteroarilenio, heteroarilenio sustituido, alcarilenio, alcarilenio, aralquilenio o aralquilenio sustituido;

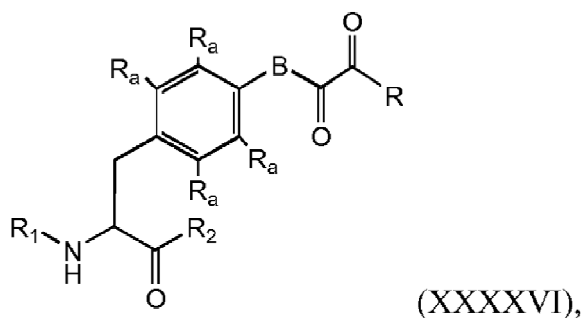
B es opcional y, cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquilenio inferior, alquilenio inferior sustituido, alquenilenio inferior, alquenilenio sustituido inferior, heteroalquilenio, heteroalquilenio sustituido inferior, -O-, -O- (alquilenio o alquilenio sustituido)-, -S-, -S- (alquilenio o alquilenio sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k (alquilenio o alquilenio sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)- (alquilenio o alquilenio sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquilenio o alquilenio sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alquilenio o alquilenio sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquilenio o alquilenio sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')- (alquilenio o alquilenio sustituido)-, -N(R')CO- (alquilenio o alquilenio sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

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

R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido de protección.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0201] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXVI):



donde,

B es opcional y, cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquilenio inferior,

alquilenos sustituido inferior, alquilenos inferior, alquilenos sustituido inferior, heteroalquilenos, heteroalquilenos sustituido inferior, -O-, -O- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -S-, -S- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')CO- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

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

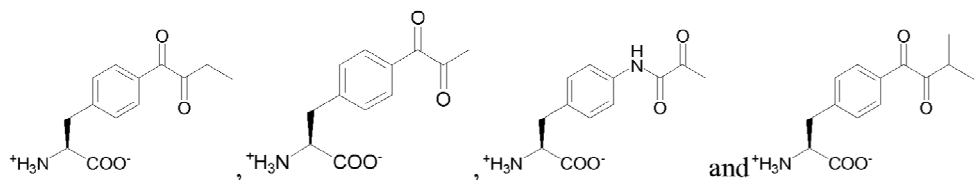
R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector;

en el que cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR', donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido.

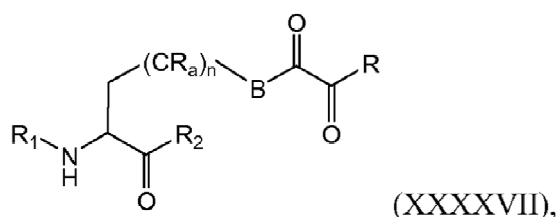
Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0202] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



en el que dichos compuestos están opcionalmente amino protegidos y carboxilo protegido, o una sal de los mismos. Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0203] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXVII): en la que,



B es opcional y, cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior, alquilenos sustituido inferior, heteroalquilenos, heteroalquilenos sustituido inferior, -O-, -O- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -S-, -S- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')CO- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

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

R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

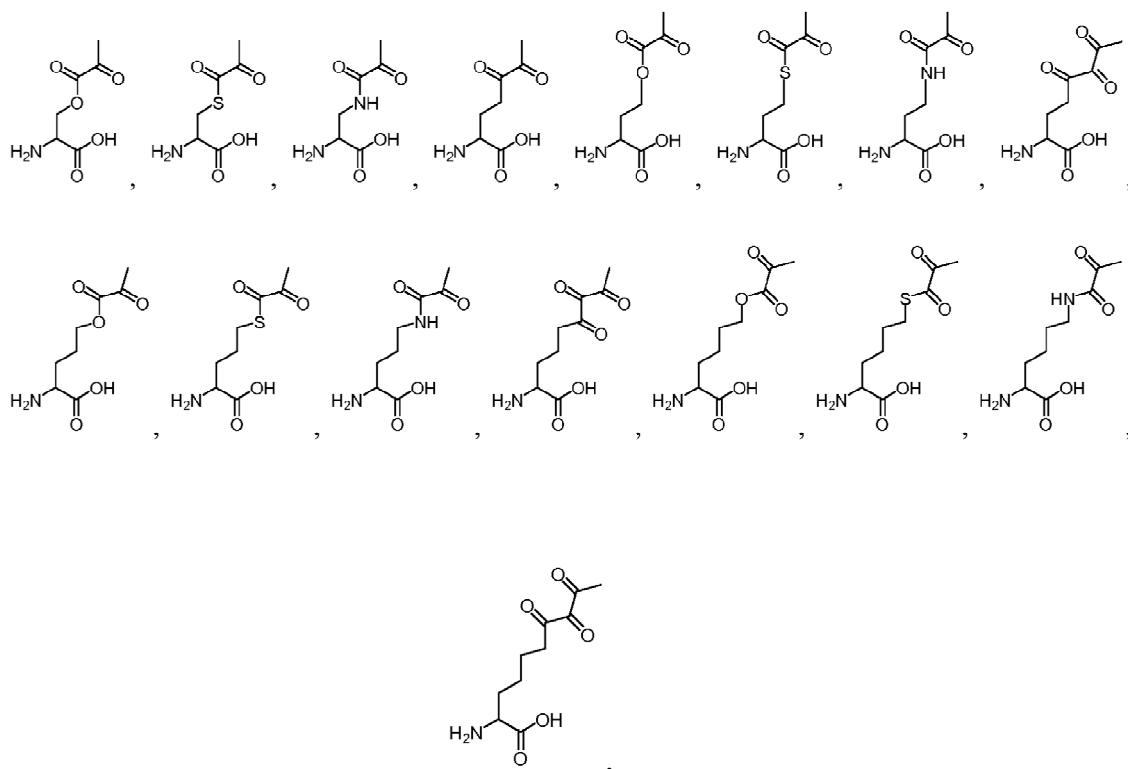
R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector;

cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR', donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H,

alquilo, o alquilo sustituido; y n es 0-8.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

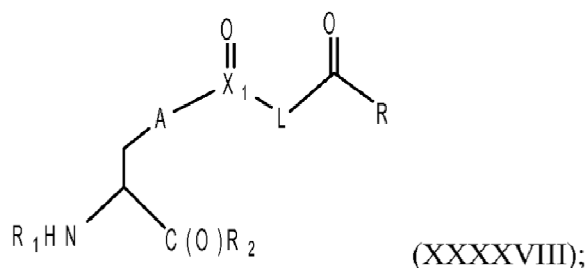
[0204] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



y

en el que dichos compuestos están opcionalmente amino protegidos y carboxilo protegido, o una sal de los mismos, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0205] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXVIII):



donde:

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

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

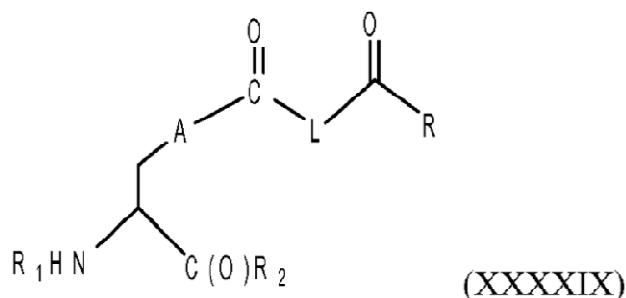
R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

R_2 es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector;

X_1 es C, S, o S(O); y L es alquileo, alquileo sustituido, N(R') (alquileo) o N(R') (alquileo sustituido), en donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

5 Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

10 **[0206]** Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXIX):



25 donde:

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

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

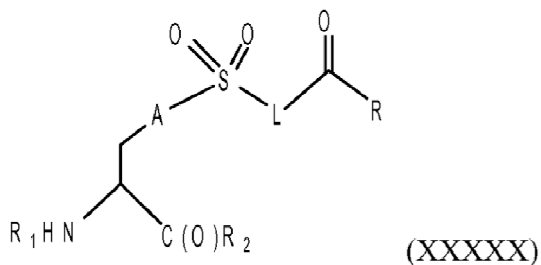
R_1 es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

35 R_2 es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector;

L es alquileo, alquileo sustituido, N(R') (alquileo) o N(R') (alquileo sustituido), en donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

40 Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

45 **[0207]** Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXX):



55 donde:

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

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

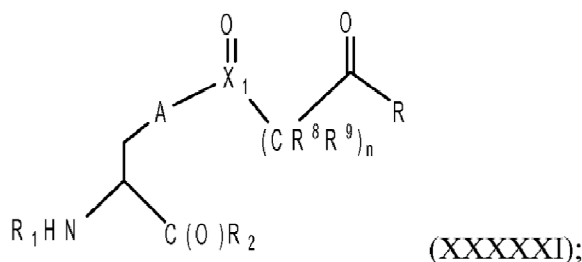
65 R_1 es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

R_2 es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector;

L es alquileno, alquileno sustituido, N(R') (alquileno) o N(R') (alquileno sustituido), en donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0208] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXI):



donde:

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

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

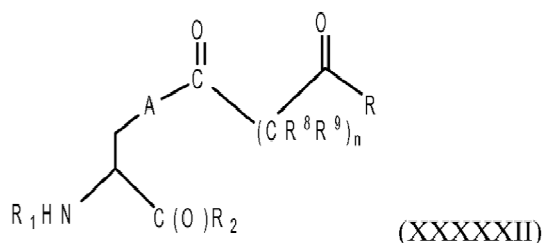
R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector;

X_1 es C, S, o S(O); y n es 0, 1, 2, 3, 4, o 5; y cada R^8 y R^9 en cada grupo CR^8R^9 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, o cualquier R^8 y R^9 pueden juntos formar =O o un cicloalquilo, o cualesquiera grupos R^8 adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0209] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXII):



donde:

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

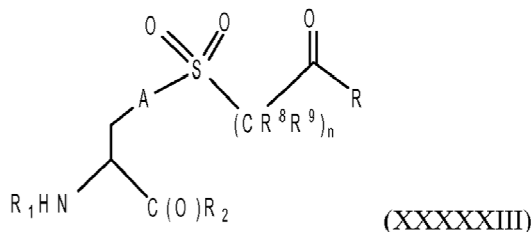
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

R¹ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipeptido o polinucleótido protector; y
R² es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipeptido o polinucleótido protector; n es 0, 1, 2, 3, 4, o 5; y cada
R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxí,
alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o
cualesquiera grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0210] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXIII):

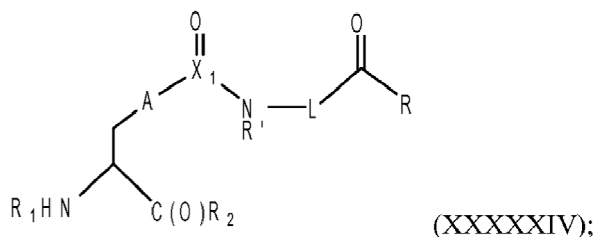


donde:

A es opcional y, cuando está presente es alquilenos inferior, alquilenos sustituido inferior, cicloalquilenos, cicloalquilenos sustituido inferior, alquilenos, alquilenos sustituido inferior, alquilenos, heteroalquilenos inferior, heteroalquilenos sustituido, heterocicloalquilenos inferior, heterocicloalquilenos inferior sustituido, arilenos, arilenos sustituido, heteroarilenos, heteroarilenos sustituido, alcarilenos, alcarilenos, aralquilenos o aralquilenos sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; n es 0, 1, 2, 3, 4, o 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualesquiera grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0211] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXIV):



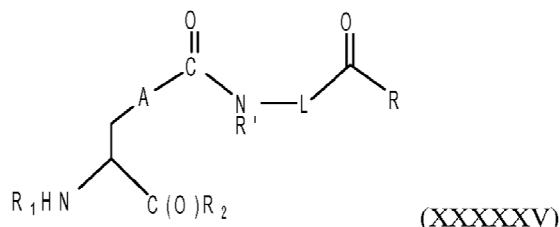
donde:

A es opcional y, cuando está presente es alquilenos inferior, alquilenos sustituido inferior, cicloalquilenos, cicloalquilenos sustituido inferior, alquilenos, alquilenos sustituido inferior, alquilenos, heteroalquilenos inferior, heteroalquilenos sustituido, heterocicloalquilenos inferior, heterocicloalquilenos inferior sustituido, arilenos, arilenos sustituido, heteroarilenos, heteroarilenos sustituido, alcarilenos, alcarilenos, aralquilenos o aralquilenos sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; X₁ es C, S, o S(O); y L es alquilenos, alquilenos sustituido, N(R') (alquilenos) o N(R') (alquilenos sustituido), en donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de

aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0212] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXV):



donde:

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

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

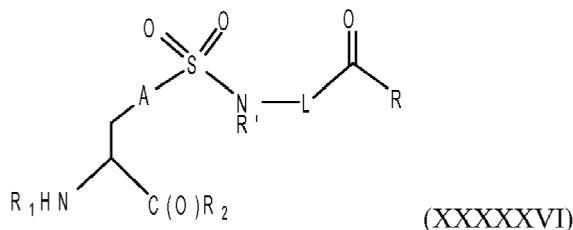
R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector;

L es alquileo, alquileo sustituido, N(R') (alquileo) o N(R') (alquileo sustituido), en donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0213] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXVI):



donde:

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

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

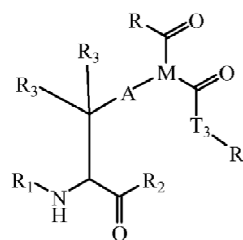
R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y

R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector;

L es alquileo, alquileo sustituido, N(R') (alquileo) o N(R') (alquileo sustituido), en donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

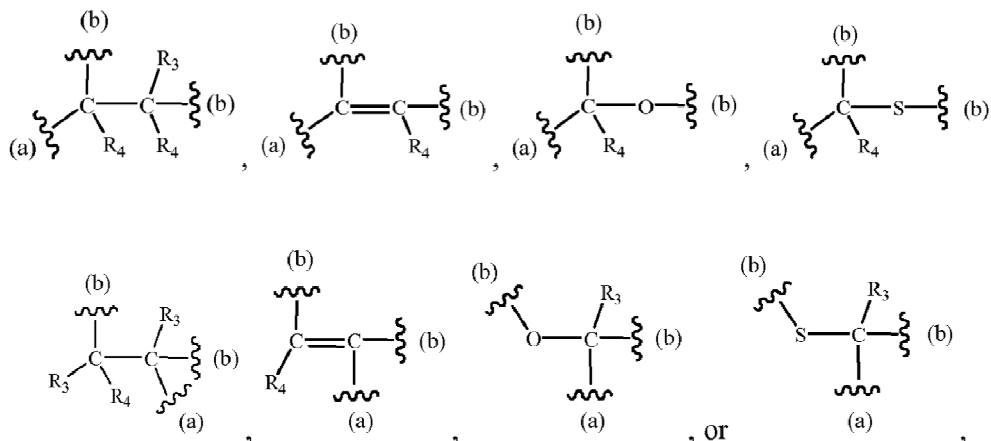
[0214] Además, los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXVII) están incluidos:



(XXXXXXVII),

donde:

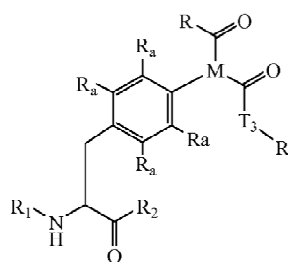
A es opcional y, cuando está presente es alquileno inferior, alquileno sustituido inferior, cicloalquileno, cicloalquileno sustituido inferior, alquenileno, alquenileno sustituido inferior, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno, aralquileno o aralquileno sustituido; M es -C(R₃)-,



donde (a) indica la unión al grupo A y (b) indica la unión a los respectivos grupos carbonilo, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ o dos grupos R₄ opcionalmente forman un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; T₃ es un enlace, C(R)(R), O, o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido de protección.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

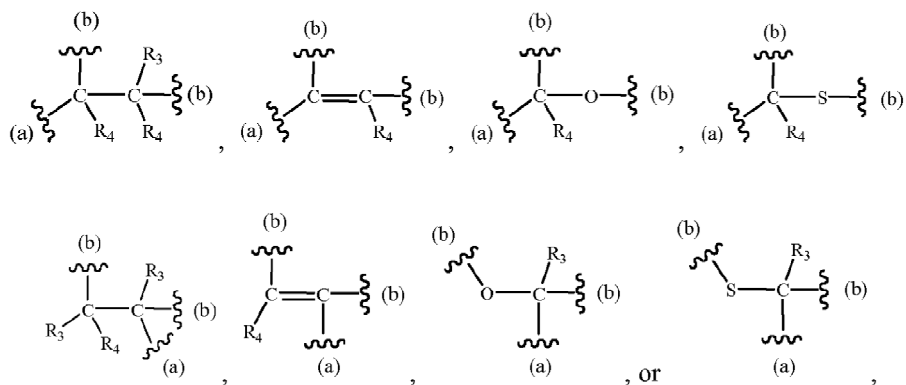
[0215] Además, los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXVIII) están incluidos:



(XXXXXXVIII),

donde:

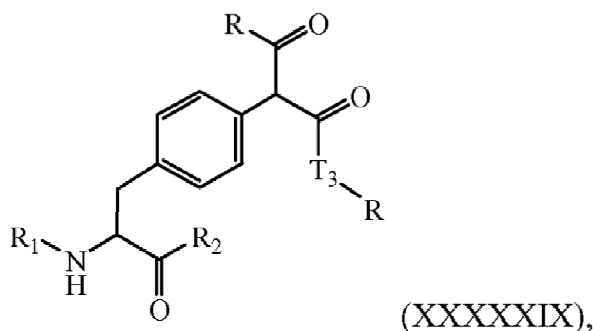
M es -C (R₃)-,



donde (a) indica la unión al grupo A y (b) indica la unión a los respectivos grupos carbonilo, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ o dos grupos R₄ opcionalmente forman un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; T₃ es un enlace, C (R) (R), O, o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; y R₂ es OH, un grupo éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido protector; cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR', donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0216] Además, los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXIX) están incluidos:

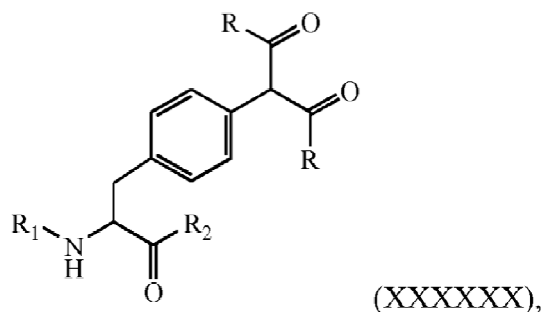


donde:

R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; y T₃ es O o S.

Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

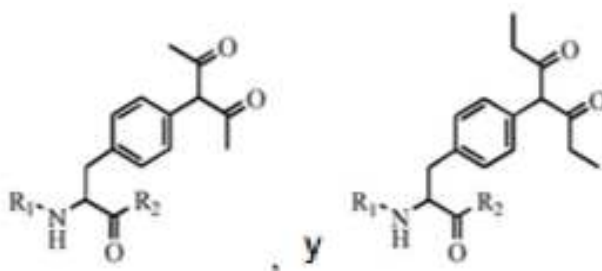
[0217] Además, los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXX) están incluidos:



donde:

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

[0218] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen estructuras de Fórmula (XXXXXX):



Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y, opcionalmente, modificado postraslacionalmente.

[0219] La funcionalidad de carbonilo o dicarbonilo puede hacerse reaccionar selectivamente con un reactivo que contiene hidroxilamina en condiciones suaves en disolución acuosa para formar el enlace oxima correspondiente que es estable en condiciones fisiológicas. Véase, por ejemplo, Jencks, W.P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tam, J.P., J. Am. Chem. Soc. 117 (14): 3893 a 3899 (1995). Además, la reactividad única del grupo carbonilo o dicarbonilo permite la modificación selectiva en presencia de las otras cadenas laterales de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Cornish, V.W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118: 8150-8151 (1996); Geoghegan, K.F. y Stroh, J.G., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992); Mahal, L.K. y otros, Science 276: 1125-1128 (1997).

[0220] La síntesis de p-acetilo-(+/-)-fenilalanina y m-acetilo-(+/-)-fenilalanina se describe en Zhang, Z., y otros, Biochemistry 42: 6735-6746 (2003). Otros aminoácidos que contienen carbonilo o dicarbonilo se pueden preparar de manera similar.

[0221] En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un aminoácido no natural se modifica químicamente para generar un grupo funcional reactivo de carbonilo o dicarbonilo. Por ejemplo, una funcionalidad de aldehído útil para reacciones de conjugación se puede generar a partir de una funcionalidad que tiene grupos amino e hidroxilo adyacentes. Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, por ejemplo, un N-terminal de serina o treonina (que puede ser normalmente presente o puede exponerse a través de digestión química o enzimática) se puede utilizar para generar una funcionalidad de aldehído en condiciones de escisión oxidante suaves utilizando peryodato. Véase, por ejemplo, Gaertner, et. al., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992); Gaertner et al., J. Biol. Chem. 269: 7224-7230 (1994). Sin embargo, los métodos conocidos en la técnica se limitan a los aminoácidos en el extremo N-terminal del péptido o proteína.

[0222] Además, a modo de ejemplo un aminoácido no natural que lleva grupos hidroxilo y amino adyacentes puede

incorporarse en un polipéptido como una funcionalidad de aldehído "enmascarado". Por ejemplo, 5-hidroxisilina lleva un grupo hidroxilo adyacente a la amina épsilon. Las condiciones de reacción para generar el aldehído típicamente implican la adición de un exceso molar de metaperyodato de sodio en condiciones suaves para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación es típicamente de aproximadamente 7,0. Una reacción típica implica la adición de aproximadamente 1,5 de exceso molar de peryodato meta sodio a una solución tamponada del polipéptido, seguido de incubación durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.423.685.

V. Derivados de dolastatina vinculados a aminoácido no natural

[0223] En otro aspecto descrito en este documento métodos, estrategias y técnicas para la incorporación de al menos uno de tales derivados enlazadores de dolastatina en un aminoácido no natural. También se incluyen con este aspecto métodos para producir, purificar, caracterizar y usar dichos derivados enlazadores de dolastatinaes que contienen al menos uno de tal aminoácido no natural. También se incluye con este aspecto composiciones de y métodos para producir, purificar, caracterizar y utilizar oligonucleótidos (incluyendo ADN y ARN) que se pueden utilizar para producir, al menos en parte, un derivado enlazador de dolastatina que contiene al menos un aminoácido no natural. También se incluye con este aspecto composiciones de y métodos para producir, purificar, caracterizar y usar las células que pueden expresar dichos oligonucleótidos que se pueden usar para producir, al menos en parte, un derivado enlazador de dolastatina que contiene al menos un aminoácido no natural.

[0224] Por lo tanto, derivados enlazadores de dolastatina que comprenden al menos un aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado con un grupo carbonilo, dicarbonilo, alquino, cicloalquino, azida, oxima o hidroxilamina se proporcionan y se describen en este documento. En ciertas realizaciones, derivados enlazadores de dolastatina con al menos un aminoácido no natural o aminoácido natural no modificado con un carbonilo, dicarbonilo, alquino, cicloalquino, azida, oxima o grupo hidroxilamina incluye al menos una modificación post-traducciona en alguna posición en el polipéptido. En algunas realizaciones la modificación co-traducciona o postraducciona se produce a través de la maquinaria celular (por ejemplo, glicosilación, acetilación, acilación, modificación lípida, palmitoilación, además palmitato, la fosforilación, la modificación glicolípido-vinculación, y similares), en muchas instancias, tales modificaciones co-traduccionales o postraduccionales basadas en maquinaria celular se producen en los sitios aminoácidos naturales en el polipéptido, sin embargo, en ciertas realizaciones, las modificaciones co-traduccionales o postraduccionales basadas en maquinaria celular se producen en el sitio de aminoácidos no naturales en el polipéptido.

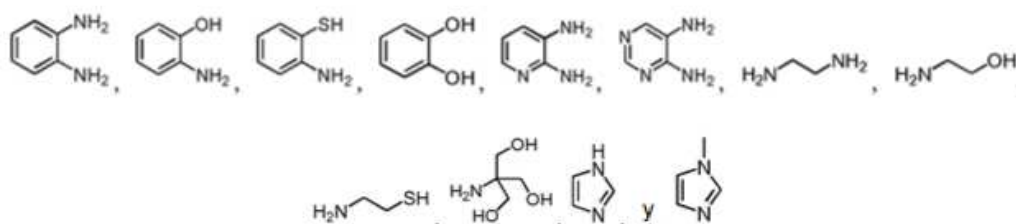
[0225] En otras realizaciones, la modificación postraducciona no utiliza la maquinaria celular, pero la funcionalidad en cambio se proporciona mediante la unión de una molécula (un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado de polietilenglicol, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y cualquier combinación de los mismos) que comprende un segundo grupo reactivo con al menos un aminoácido no natural que comprende un primer grupo reactivo (incluyendo pero no limitado a un aminoácido no natural que contiene una cetona, aldehído, acetal, hemiacetal, alquino, cicloalquina, azida, oxima, o grupo funcional de hidroxilamina) utilizando metodología química descrita en la presente memoria, u otros apropiados para los grupos reactivos particulares. En ciertas realizaciones, la modificación co-traducciona o postraducciona se hace *in vivo* en una célula eucariota o en una célula no eucariota. En ciertas realizaciones, la modificación posterior a la traducción se realiza *in vitro* no utilizando la maquinaria celular. También se incluyen en este aspecto métodos para la producción, purificación, caracterización y uso de tales derivados enlazadores de dolastatina que contienen al menos un aminoácido no natural modificado co-traduccionalmente o postraduccionalmente.

[0226] También se incluyen dentro del alcance de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en el presente documento reactivos capaces de reaccionar con un derivado enlazador de dolastatina (que contiene un grupo carbonilo o dicarbonilo, un grupo oxima, alquino, cicloalquino, azida, grupo hidroxilamina, o enmascarado o formas protegidas de los mismos) que es parte de un polipéptido para producir cualquiera de las antes mencionadas modificaciones postraduccionales. En ciertas realizaciones, el derivado enlazador de dolastatina postraducciona modificado resultante contendrá al menos un grupo oxima; el derivado enlazador de dolastatina resultante modificado que contiene oxima puede someterse a reacciones de modificación posteriores. También se incluyen con este aspecto métodos para producir, purificar, caracterizar y usar tales reactivos que son capaces de cualquiera de tales modificaciones postraduccionales de tal derivado enlazador de dolastatina.

[0227] En ciertas realizaciones, el polipéptido o derivado de dolastatina vinculado de aminoácidos no naturales incluye al menos una modificación co-traducciona o postraduccionales que se hace *in vivo* por una célula huésped, donde la modificación postraducciona no se hace normalmente por otro tipo de célula huésped. En ciertas realizaciones, el polipéptido incluye al menos una modificación co-traducciona o postraducciona que se hace *in vivo* por una célula eucariota, cuando la modificación co-traducciona o postraducciona no se hace normalmente por una célula no eucariota. Ejemplos de tales modificaciones co-traducciona o postraduccionales incluyen, pero no se limitan a glicosilación, acetilación, acilación, lípido-modificación, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación de vinculación de glicolípido, y similares. En una realización, la modificación co-traducciona o postraducciona comprende la fijación de un oligosacárido a una asparagina por un enlace GlcNAc-asparagina (incluyendo pero no limitado a, donde los oligosacáridos comprenden (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc, y

similares). En otra realización, la modificación co-traducciona l o postraducciona l comprende la fijación de un oligosacárido (incluyendo pero no limitado a, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina por una GalNAc-serina, una GalNAc-treonina, una GlcNAc-serina, o un enlace GlcNAc-treonina. En ciertas realizaciones, una proteína o polipéptido puede comprender una secuencia de secreción o localización, una etiqueta de epítipo, una etiqueta FLAG, una etiqueta de polihistidina, una fusión GST, y/o similares. También se incluyen con este aspecto métodos para producir, purificar, caracterizar y usar tales polipéptidos que contienen la modificación de al menos una modificación co-traducciona l o postraducciona l. En otras realizaciones, el polipéptido de aminoácidos no naturales glicosilado se produce en una forma no glicosilada. Tal forma no glicosilada de un aminoácido no natural glicosilado puede producirse por métodos que incluyen la eliminación enzimática de los grupos de oligosacáridos a partir de un polipéptido de aminoácidos aislado o sustancialmente purificado o no purificado glicosilado no natural; la producción del aminoácido no natural en un huésped que no glicosila tal polipéptido no natural de aminoácido (un anfitrión que incluye procariontas o eucariotas genéticamente mutadas para no glicosilar un tal polipéptido), la introducción de un inhibidor de glicosilación en el medio de cultivo celular en el que dicho polipéptido de aminoácidos no naturales está siendo producido por un eucariota que normalmente glicosila tal polipéptido, o una combinación de cualquiera de estos métodos. También se describe aquí tales formas no glicosiladas de los polipéptidos de aminoácidos naturales no normalmente glicosilados (por normalmente glicosilado se entiende un polipéptido que se glicosila cuando produce bajo condiciones en las que los polipéptidos de origen natural están glicosilados). Por supuesto, tales formas no glicosiladas de los polipéptidos de aminoácidos no naturales normalmente glicosilados (o de hecho cualquier polipéptido descrito en el presente documento) pueden estar en una forma no purificada, una forma sustancialmente purificada, o en una forma aislada.

[0228] En ciertas realizaciones, el polipéptido de aminoácidos no naturales incluye al menos una modificación después de la traducción que se hace en presencia de un acelerador, en el que la modificación postraducciona l es estequiométrica, estequiométrica como, o casi estequiométrica. En otras realizaciones, el polipéptido se pone en contacto con un reactivo de fórmula (XIX) en presencia de un acelerador. En otras realizaciones, el acelerador se selecciona del grupo que consiste en:

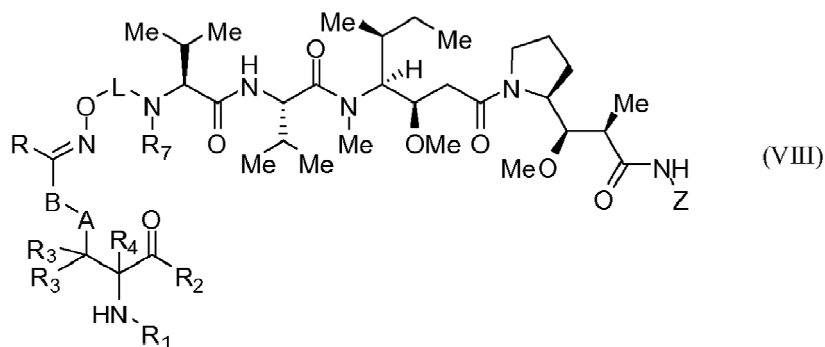


A. Síntesis química de los derivados de dolastatina vinculados de aminoácidos no naturales: derivados de dolastatina vinculados que contienen oxima

[0229] Los derivados de dolastatina vinculados de aminoácido no naturales que contienen un grupo de oxima permiten la reacción con una variedad de reactivos que contienen ciertos grupos reactivo de carbonilo o dicarbonilo (incluyendo pero no limitado a, cetonas, aldehídos, u otros grupos con similar reactividad) para formar nuevos aminoácidos no naturales que comprenden un nuevo grupo de oxima. Tal intercambio de reacción de oxima permite la funcionalización adicional de los derivados de dolastatina vinculados. Además, el derivado original vinculado a dolastatina que contiene un grupo de oxima puede ser útil en sí, siempre que el enlace de oxima es estable bajo las condiciones necesarias para incorporar el aminoácido en un polipéptido (por ejemplo, los métodos *in vivo*, *in vitro* y de síntesis química descritos en este documento).

[0230] Por lo tanto, en ciertas realizaciones descritas en este documento están derivados vinculados de dolastatina de aminoácidos no naturales con cadenas laterales que comprenden un grupo de oxima, un grupo similar (que tiene una reactividad similar a un grupo de oxima y es estructuralmente similar a un grupo de oxima), un grupo de oxima enmascarado (que se puede convertir fácilmente en un grupo de oxima), o un grupo de oxima protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo de oxima, tras la desprotección).

[0231] Los derivados vinculados a dolastatina de aminoácidos no naturales de la invención incluyen los derivados vinculados a dolastatina que tienen la estructura de Fórmula (VIII):



donde:

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

B es opcional y, cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno sustituido inferior, heteroalquileo, sustituido heteroalquileo inferior, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

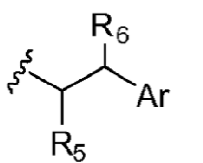
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es H, un grupo protector de amino, resina, al menos un aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

R₂ es OH, un grupo protector de éster, resina, al menos un aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

Z tiene la estructura de:



R⁵ es H, COR⁸ C₁-C₆ alquilo, o tiazol;
 R⁸ es OH
 R₆ es OH o H;
 Ar es fenilo o piridina;

R₇ es C₁-C₆ alquilo o hidrógeno;

L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en -alquileo-, - (alquileo-O)_n-alquileo-; y n es un número entero mayor que o igual a uno; o un solvato del mismo.

[0232] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), R₅ es tiazol. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), R₆ es H. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), Ar es fenilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), R₇ es metilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), n es un número entero de 0 a 20. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), n es un número entero de 0 a 10. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), n es un número entero de 0 a 5.

[0233] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), R₅ es tiazol. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), R₅ es hidrógeno. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), R₅ es

metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, o hexilo.

[0234] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), R_6 es H.

5 **[0235]** En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), Ar es fenilo.

[0236] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), R_7 es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo, o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R_7 es hidrógeno.

10 **[0237]** En ciertas realizaciones de compuestos de fórmula (VIII), cada alquileo es independientemente $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, o $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), alquileo es metileno, etileno, propileno, butilenos, pentileno, hexileno o heptileno.

15 **[0238]** En ciertas realizaciones de compuestos de fórmula (VIII), cada n es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100.

20 **[0239]** En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), R_1 es un polipéptido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), R_2 es un polipéptido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII), el anticuerpo es herceptina.

25 **[0240]** En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula (VIII) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula (VIII) son estables durante al menos 2 semanas bajo condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, el compuesto de fórmula (VIII) son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, tales condiciones ácidas son pH 2 a 8. Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado postraslacionalmente.

30 **[0241]** Aminoácidos no naturales pueden ser sintetizados por métodos ya descritos en la técnica, o por métodos descritos aquí, incluyendo: (a) reacción de un aminoácido no natural que contiene hidroxilamina con un reactivo que contiene carbonilo o dicarbonilo; (b) reacción de aminoácido no natural de carbonilo o dicarbonilo con un reactivo que contiene hidroxilamina; o (c) reacción de un aminoácido no natural que contiene oxima con ciertos reactivos que contienen carbonilo o dicarbonilo.

VI. Localización de aminoácidos no naturales en derivados enlazadores de dolastatina

45 **[0242]** Los métodos y composiciones descritas en la presente invención incluyen la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en un derivado enlazador de dolastatina. Uno o más aminoácidos no naturales pueden ser incorporados en una o más posiciones particulares que no perturben la actividad del derivado enlazador de dolastatina. Esto puede lograrse al hacer sustituciones "conservadoras", incluyendo, pero no limitado a, la sustitución de aminoácidos hidrófobos con ácidos no naturales o naturales hidrofóbicos, aminoácidos voluminosos con aminoácidos voluminosos no naturales o naturales, aminoácidos hidrófilos con aminoácidos no naturales o naturales hidrófilos) y/o insertar el aminoácido no natural en una ubicación que no se requiere para la actividad. Una variedad de enfoques bioquímicos y estructurales se puede emplear para seleccionar los sitios deseados para la sustitución con un aminoácido no natural dentro del derivado enlazador de dolastatina. En algunas formas de realización, el aminoácido no natural está unido en el extremo C-terminal del derivado de dolastatina. En otras formas de realización, el aminoácido no natural está vinculado en el extremo N-terminal del derivado de dolastatina. Cualquier posición del derivado enlazador de dolastatina es adecuada para la selección para incorporar un aminoácido no natural, y la selección puede estar basada en el diseño racional o por selección aleatoria por cualquier o ningún propósito deseado particular. La selección de sitios deseados puede basarse en la producción de un polipéptido de aminoácidos no naturales (que se puede modificar adicionalmente o permanecer sin modificarse) que tiene cualquier propiedad o actividad deseada, incluyendo pero no limitado a un receptor de moduladores de unión, moduladores de actividad del receptor, moduladores de unión a socios aglomerantes, moduladores de actividad de socio de unión, moduladores de conformación de socio de unión, la formación de dímero o multímero de unión, no hay cambio a actividad o propiedad en comparación con la molécula nativa, o manipulación de cualquier propiedad física o química del polipéptido tales como la solubilidad, la agregación, o la estabilidad. Alternativamente, los sitios identificados como críticos para la actividad biológica también pueden ser buenos candidatos para la sustitución con un aminoácido no natural, de nuevo dependiendo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Otra alternativa sería simplemente hacer sustituciones de serie en cada posición en la cadena de polipéptido con un

aminoácido no natural y observar el efecto sobre las actividades del polipéptido. Cualquier medio, técnica o método para seleccionar una posición para la sustitución con un aminoácido no natural en cualquier polipéptido es adecuado para su uso en los métodos, técnicas y composiciones descritas en el presente documento.

[0243] La estructura y la actividad de los mutantes de origen natural de un polipéptido que contiene delecciones también pueden examinarse para determinar las regiones de la proteína que son susceptibles de ser tolerantes con la sustitución con un aminoácido no natural. Una vez que los residuos propensos a ser intolerantes a la sustitución con aminoácidos no naturales han sido eliminados, el impacto de las sustituciones propuestas en cada una de las posiciones restantes se puede examinar utilizando métodos incluyendo, pero no limitado a, la estructura tridimensional del polipéptido relevante, y cualesquiera ligandos asociados o proteínas de unión. Estructuras de rayos X cristalográficas y RMN de muchos polipéptidos están disponibles en el Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org), una base de datos centralizada que contiene datos estructurales tridimensionales de grandes moléculas de proteínas y ácidos nucleicos, uno se puede utilizar para identificar las posiciones de aminoácidos que pueden ser sustituidas con aminoácidos no naturales. Además, los modelos se pueden realizar mediante la investigación de la estructura secundaria y terciaria de los polipéptidos, si los datos de la estructura tridimensional no están disponibles. Por lo tanto, la identidad de las posiciones de aminoácidos que pueden sustituirse con aminoácidos no naturales se puede obtener fácilmente.

[0244] Sitios de incorporación ejemplar de un aminoácido no natural incluyen, pero no se limitan a, aquellos que están excluidos de las regiones potenciales de unión al receptor, o regiones para la unión a proteínas de unión o ligandos pueden ser total o parcialmente expuestos, tener interacciones de unión de hidrógeno mínimas o inexistentes con residuos cercanos, pueden estar mínimamente expuestos a los residuos de reactivos cercanos, y/o pueden estar en regiones que son altamente flexibles como se ha predicho por la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido particular con su receptor asociado, el ligando o proteínas de unión.

[0245] Una amplia variedad de aminoácidos no naturales puede ser sustituida por, o se incorpora a una posición dada en un polipéptido. A modo de ejemplo, un aminoácido no natural particular puede ser seleccionado para su incorporación sobre la base de un examen de la estructura cristalina de tres dimensiones de un polipéptido con su ligando asociado, receptor y/o proteínas de unión, una preferencia por sustituciones conservadoras.

[0246] En una realización, los métodos descritos en este documento incluyen la incorporación en el derivado enlazador de dolastatina, en donde el derivado enlazador de dolastatina comprende un primer grupo reactivo; y la puesta en contacto del derivado enlazador de dolastatina con una molécula (incluyendo pero no limitado a una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y cualquier combinación de los mismos) que comprende un segundo grupo reactivo. En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo es un resto de hidroxilamina y el segundo grupo reactivo es un resto de carbonilo o dicarbonilo, con lo que se forma un enlace de oxima. En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo es un resto de carbonilo o dicarbonilo y el segundo grupo reactivo es un resto de hidroxilamina, con lo que se forma un enlace oxima. En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo es un resto de carbonilo o dicarbonilo y el segundo grupo reactivo es un resto de oxima, con lo que se produce una reacción de intercambio de oxima. En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo es un resto de oxima y el segundo grupo reactivo es un resto de carbonilo o dicarbonilo, con lo cual se produce una reacción de intercambio de oxima.

[0247] En algunos casos, la incorporación del derivado enlazador de dolastatina se puede combinar con otras adiciones, sustituciones o delecciones en el polipéptido para afectar otro producto químico, físico, farmacológico y/o rasgos biológicos. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o delecciones pueden aumentar la estabilidad (incluyendo pero no limitado a, la resistencia a la degradación proteolítica) del polipéptido o aumentar la afinidad del polipéptido por su receptor adecuado, el ligando y/o proteínas de unión. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o delecciones pueden aumentar la solubilidad (incluyendo pero no limitado a, cuando se expresa en *E. coli* u otras células de huésped) del polipéptido. En algunas realizaciones sitios se seleccionan para la sustitución con un aminoácido codificado natural o no natural además de otro sitio para la incorporación de un aminoácido no natural con el propósito de aumentar la solubilidad del polipéptido después de la expresión en *E. coli*, u otro recombinante de células huésped. En algunas realizaciones, los polipéptidos comprenden otra adición, sustitución o delección que modula la afinidad por el ligando asociado, proteínas de unión, y/o receptor, modula (incluyendo pero no limitado a, incrementos o disminuciones) la dimerización del receptor, estabiliza dímeros de receptores, modula la vida media en circulación, modula la liberación o la biodisponibilidad, facilita la purificación, o mejora o altera una ruta particular de administración. Del mismo modo, el polipéptido de aminoácidos no naturales puede comprender secuencias de escisión química o enzimática, secuencias de escisión de proteasa, grupos reactivos, dominios de unión de anticuerpos (incluyendo, pero no limitado a, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (incluyendo pero no limitado a, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas enlazadas (incluyendo pero no limitado a biotina) que mejoran la detección (incluyendo pero no limitado a, GFP), la purificación, el transporte a través de los tejidos o membranas celulares, liberación de profármacos o activación, reducción de tamaño, u otros rasgos del polipéptido.

VII. Gen *HER₂* como Ejemplar

[0248] Los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en el presente documento no se limitan a un tipo particular, la clase o familia de polipéptidos o proteínas. De hecho, prácticamente todos los polipéptidos pueden ser diseñados o modificados para incluir al menos aminoácidos no naturales "modificados o no modificados" que contienen aminoácidos de derivados enlazadores de dolastatina se describen en este documento. A modo solamente de ejemplo, el polipéptido puede ser homólogo a una proteína terapéutica seleccionada de entre el grupo que consiste en: antitripsina alfa-1, angiostatina, factor de antihemolítica, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, anticuerpo monoclonal (por ejemplo, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, infliximab, adalimumab, basiliximab, daclizumab, omalizumab, ustekinumab, etanercept, gemtuzumab, alemtuzumab, rituximab, trastuzumab, nimotuzumab, palivizumab, y abciximab), apolipoproteína, apoproteína, factor natriurético atrial, polipéptido natriurético atrial, péptido atrial, quimiocinas C-X-C, T39765, NAP-2, ENA-78, gro-a, gro-b, gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG, calcitonina, ligando c-kit, citoquina, quimioquinas CC, MCP-1, MCP-2, MCP-3, proteína inflamatoria de monocitos-1 alfa, proteína inflamatoria de monocitos-i beta, RANTES, 1309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262, CD40, ligando CD40, ligando c-kit, colágeno, factor estimulante de colonias (CSF), factor del complemento 5a, inhibidor del complemento, receptor del complemento 1, citoquina, neutrófilos epiteliales de péptido activador-78, MIP-16, MCP-1, péptido factor de crecimiento epidérmico (EGF), 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), fibrinógeno, fibronectina, proteína de haz 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), hirudina, hormona de crecimiento humana (hGH), albúmina de suero humano, ICAM-1, receptor de ICAM-1, LFA-1, receptor de LFA-1, insulina, insulina como factor de crecimiento (IGF), 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), lactoferrina, factor inhibidor de leucemia, luciferasa, neurturina, factor inhibidor de neutrófilos (NIF), oncostatina M, proteína osteogénica, producto de oncogenes, paracitonin, hormona paratiroidea, PD-ECSF, PDGF, péptido zontal Mone, 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, soluble I-CAM 1, receptor de interleucina soluble, receptor de TNF soluble, somatomedina, somatostatina, somatotropina, estreptoquinasa, superantígenos, enterotoxina estafilocócica, SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, receptor de la hormona esteroide, superóxido de dismutasa, toxina del síndrome de choque tóxico, timosina alfa 1, activador del plasminógeno tisular, factor de crecimiento tumoral (TGF), factor de necrosis tumoral, factor de necrosis tumoral alfa, factor de necrosis tumoral beta, receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR), proteínas de VLA-4, proteína de VCAM-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), uroquinasa, mos, ras, raf, met, p53, tat, fos, myc, jun, myb, rel, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, receptor de testosterona, receptor de aldosterona, receptor de LDL, y corticosterona.

[0249] En una descripción es un método para el tratamiento de tumores sólidos que sobreexpresan HER-2 seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, carcinoma de pulmón de células pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma gástrico, cáncer de cuello de útero, carcinoma de esófago y cáncer de colon. En otra realización, el tumor sólido es cáncer de mama. En una realización adicional, el tumor sólido es cáncer de ovario.

[0250] Así, se proporciona la siguiente descripción de trastuzumab con fines ilustrativos y a modo solamente de ejemplo, y no como un límite en el ámbito de aplicación de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en el presente documento. Es más, referencia a trastuzumab en esta solicitud pretende utilizar el término genérico como un ejemplo de cualquier anticuerpo. Por lo tanto, se entiende que las modificaciones y las químicas descritas en el presente documento con referencia a trastuzumab se pueden aplicar igualmente a cualquier anticuerpo monoclonal o anticuerpo, incluidos los enumerados específicamente en este documento.

[0251] Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al dominio IV del segmento extracelular del receptor HER₂/neu. El gen HER₂ (también conocido como HER₂/neu y del gen ErbB2) se amplifica en 20-30% de los cánceres de mama en fase temprana, lo que lo sobreexpresa. Además, en el cáncer, HER₂ puede enviar señales sin mitógenos que llegan y se unen a cualquier receptor, haciéndolo hiperactivo.

[0252] HER2 se extiende a través de la membrana celular, y lleva las señales de fuera de la célula en el interior. En las personas sanas, los compuestos de señalización llamados mitógenos llegan a la membrana celular, y se unen a la parte exterior de otros miembros de la familia HER de receptores. Esos receptores unidos después se enlazan (dimerizan) con HER2, activándolo. HER2 a continuación, envía una señal al interior de la célula. La señal pasa a través de diferentes vías bioquímicas. Esto incluye la vía PI3K/Akt y la vía MAPK. Estas señales promueven la invasión, la supervivencia y el crecimiento de los vasos sanguíneos (angiogénesis) de las células.

[0253] Las células tratadas con trastuzumab se someten a la detención durante la fase G1 del ciclo celular por lo que se reduce la proliferación. Se ha sugerido que trastuzumab induce parte de su efecto por regulación a la baja de HER2/neu que conduce a la interrupción de la dimerización del receptor y la señalización a través de la cascada de PI3K aguas abajo. P27Kip1 después no se fosforila y es capaz de entrar en el núcleo e inhibir la actividad cdk2, causando la detención del ciclo celular. Además, trastuzumab suprime la angiogénesis por tanto la inducción de factores antiangiogénicos y la represión de los factores proangiogénicos. Se cree que una contribución al

crecimiento no regulado observado en el cáncer podría deberse a la escisión proteolítica de HER2/neu que resulta en la liberación del dominio extracelular. Trastuzumab se ha demostrado que inhibe la escisión de ectodominio HER2/neu en células de cáncer de mama.

5 **VIII. La captación celular de aminoácidos no naturales**

[0254] la captación de aminoácidos no naturales por una célula eucariota es una cuestión que se considera típicamente cuando se designa y se selecciona aminoácidos no naturales, incluyendo, pero no limitado a, la incorporación en una proteína. Por ejemplo, la alta densidad de carga de aminoácidos α sugiere que es poco probable que estos compuestos sean permeables a las células. Aminoácidos naturales son suben a la célula eucariótica a través de una colección de sistemas de transporte basados en proteínas. Una pantalla rápida se puede realizar, la cual evalúa qué aminoácidos no naturales, si los hay, se asumen por las células (ejemplos 15 y 16 ilustran en el presente documento ejemplos no limitantes de pruebas que se pueden hacer en los aminoácidos no naturales). Véase, *por ejemplo*, los ensayos de toxicidad en, *por ejemplo*, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/198637 titulada "Protein Arrays", y Liu, DR y Schultz, PG (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. PNAS Estados Unidos 96: 4780-4785. Aunque la captación se analiza fácilmente con diversos ensayos, una alternativa para diseñar aminoácidos no naturales que son susceptibles a rutas de captación celulares es la proporción de rutas biosintéticas para crear aminoácidos *in vivo*.

[0255] Típicamente, el aminoácido no natural producido a través de la absorción celular como se describe en el presente documento se produce en una concentración suficiente para la biosíntesis de proteínas eficaz, incluyendo, pero no limitado a, una cantidad celular natural, pero no en un grado tal que se afecte la concentración de los otros aminoácidos o recursos celulares de escape. Las concentraciones típicas producidas de esta manera son aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM.

25 **IX. Biosíntesis de aminoácidos no naturales**

[0256] Muchas rutas biosintéticas ya existen en las células para la producción de aminoácidos y otros compuestos. Mientras que un método biosintético para un aminoácido no natural concreto puede no existir en la naturaleza, incluyendo pero no limitado a, en una célula, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria proporcionan dichos métodos. Por ejemplo, las rutas biosintéticas para aminoácidos no naturales pueden generarse en la célula huésped mediante la adición de nuevas enzimas o modificando rutas existentes de la célula huésped. Nuevas enzimas adicionales incluyen enzimas de origen natural o enzimas desarrolladas artificialmente. Por ejemplo, la biosíntesis de *p*-aminofenilalanina (como se presenta en un ejemplo en el documento WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of unnatural amino acids") se basa en la adición de una combinación de enzimas conocidas de otros organismos. Los genes para estas enzimas se pueden introducir en una célula eucariota mediante la transformación de la célula con un plásmido que comprende los genes. Los genes, cuando se expresan en la célula, proporcionan una ruta enzimática para sintetizar el compuesto deseado. Ejemplos de los tipos de enzimas que se añaden opcionalmente se proporcionan en este documento. Secuencias de enzimas adicionales se encuentran, *por ejemplo*, en el Genbank. Enzimas evolucionadas artificialmente se pueden añadir en una célula de la misma manera. De esta manera, la maquinaria celular y los recursos de una célula se manipulan para producir aminoácidos no naturales.

[0257] Una variedad de métodos están disponibles para la producción de nuevas enzimas para uso en rutas biosintéticas o para la evolución de las rutas existentes. Por ejemplo, la recombinación recursiva, incluyendo, pero no limitado a, como se ha desarrollado por Maxygen, Inc. (disponible en internet en www.maxygen.com), puede utilizarse para desarrollar nuevas enzimas y vías. Véase, *por ejemplo*, Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, Nature 370 (4): 389-391; y, Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 91: 10.747-10.751. Del mismo modo DesignPath™, desarrollado por Genencor (disponible en internet en genencor.com) se utiliza opcionalmente para la ingeniería de vía metabólica, incluyendo, pero no limitado a, el diseño de una vía para crear un aminoácido no natural en una célula. Esta tecnología reconstruye vías existentes en organismos huésped usando una combinación de nuevos genes, incluyendo, pero no limitado a aquellos identificados a través de la genómica funcional, la evolución molecular y diseño. Diversa Corporation (disponible en internet en diversa.com) también proporciona tecnología para el cribado rápido de bibliotecas de genes y las vías de genes, incluyendo, pero no limitado a, la creación de nuevas vías para la producción de biosíntesis de aminoácidos no naturales.

[0258] Típicamente, el aminoácido no natural producido con una ruta biosintética de ingeniería como se describe en el presente documento se produce en una concentración suficiente para la biosíntesis de proteínas eficaz, incluyendo, pero no limitado a, una cantidad celular natural, pero no en un grado tal que se afectar a la concentración de los otros aminoácidos o recursos celulares de escape. Las concentraciones típicas producidas *in vivo* de esta manera son aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM. Una vez que una célula se transforma con un plásmido que comprende los genes utilizados para producir las enzimas deseadas para una ruta específica y un aminoácido no natural que se genera, *en vivo* selecciones se utilizan opcionalmente para optimizar aún más la producción del aminoácido no natural tanto para la síntesis de proteínas ribosomal y el crecimiento celular.

X. Metodología sintética adicional

[0259] Los aminoácidos no naturales descritos en el presente documento pueden sintetizarse usando metodologías descritas en la técnica o usando las técnicas descritas en este documento o por una combinación de las mismas. Como ayuda, la siguiente tabla ofrece varios electrófilos y nucleófilos de partida que pueden combinarse para crear un grupo funcional deseado. La información proporcionada está destinada a ser ilustrativa y no limitativa con las técnicas de síntesis descritas en el presente documento.

Tabla 1: Ejemplos de vínculos covalentes y precursores de los mismos

Producto de enlace covalente	Electrófilo	Nucleófilo
Carboxamidas	Ésteres activados	aminas/anilinas
Carboxamidas	azidas de acilo	aminas/anilinas
Carboxamidas	haluros de acilo	aminas/anilinas
Ésteres	haluros de acilo	alcoholes/fenoles
Ésteres	nitrilos de acilo	alcoholes/fenoles
Carboxamidas	nitrilos de acilo	aminas/anilinas
Iminas	Aldehídos	aminas/anilinas
Hidrazonas	aldehídos o cetonas	Hidrazinas
Oximas	aldehídos o cetonas	Hidroxilaminas
Aminas de alquilo	haluros de alquilo	aminas/anilinas
Ésteres	haluros de alquilo	ácidos carboxílicos
Tioéteres	haluros de alquilo	Tioles
Éteres	haluros de alquilo	alcoholes/fenoles
Tioéteres	sulfonatos de alquilo	Tioles
Ésteres	sulfonatos de alquilo	ácidos carboxílicos
Ésteres	sulfonatos de alquilo	alcoholes/fenoles
Ésteres	Anhídridos	alcoholes/fenoles
Carboxamidas	Anhídridos	aminas/anilinas
Tiofenoles	haluros de arilo	Tioles
Arlaminas	haluros de arilo	Aminas
Tioéteres	Azindines	Tioles
Ésteres de boronato	Boratos	Glicoles
Carboxamidas	ácidos carboxílicos	aminas/anilinas
Ésteres	ácidos carboxílicos	Alcoholes
hidrazinas	Hidrazidas	ácidos carboxílicos
N-acylureas o Anhídridos	carbodiimidas	ácidos carboxílicos
Ésteres	diazoalcanos	ácidos carboxílicos
Tioéteres	Epóxidos	Tioles
Tioéteres	haloacetamidas	Tioles
Ammotriazines	halotriazines	aminas/anilinas
Éteres de Triazinilo	halotriazines	alcoholes/fenoles
Amidinas	ésteres imido	aminas/anilinas
Ureas	isocianatos	aminas/anilinas
Uretanos	isocianatos	alcoholes/fenoles
Tioureas	isotiocianatos	aminas/anilinas
Tioéteres	Maleimidas	Tioles
Ésteres de fosfito	fosforamiditas	Alcoholes
Éteres de sililo	haluros de sililo	Alcoholes
Aminas de alquilo	ésteres de sulfonato	aminas/anilinas
Tioéteres	ésteres de sulfonato	Tioles
Ésteres	ésteres de sulfonato	ácidos carboxílicos
Éteres	ésteres de sulfonato	Alcoholes
Sulfonamidas	haluros de sulfonilo	aminas/anilinas
Ésteres de sulfonato	haluros de sulfonilo	fenoles/alcoholes

[0260] En general, los electrófilos de carbono son susceptibles al ataque por nucleófilos complementarios, incluyendo nucleófilos de carbono, en el que un nucleófilo atacante aporta un par de electrones al electrófilo de carbono con el fin de formar un nuevo enlace entre el nucleófilo y el electrófilo de carbono

[0261] Los ejemplos no limitantes de nucleófilos de carbono incluyen, pero no se limitan a alquilo, alquénilo, arilo y alquinilo de Grignard, organolitio, organocinc, reactivos de alquilo, alquénilo, arilo y alquinilo-borano (Organoestannanos), reactivos de alquilo, alquénilo, arilo y alquinilo-borano (organoboranos y organoboronatos); estos nucleófilos de carbono tienen la ventaja de ser cinéticamente estables en agua o disolventes orgánicos polares. Otros ejemplos no limitantes de nucleófilos carbonados incluyen iluros de fósforo, reactivos enol y enolato; estos nucleófilos de carbono tienen la ventaja de ser relativamente fáciles de generar a partir de precursores bien conocidos por los expertos en la técnica de la química orgánica sintética. Nucleófilos de carbono, cuando se utilizan en conjunto con electrófilos de carbono, generan nuevos enlaces carbono-carbono entre el nucleófilo de carbono y electrófilo de carbono.

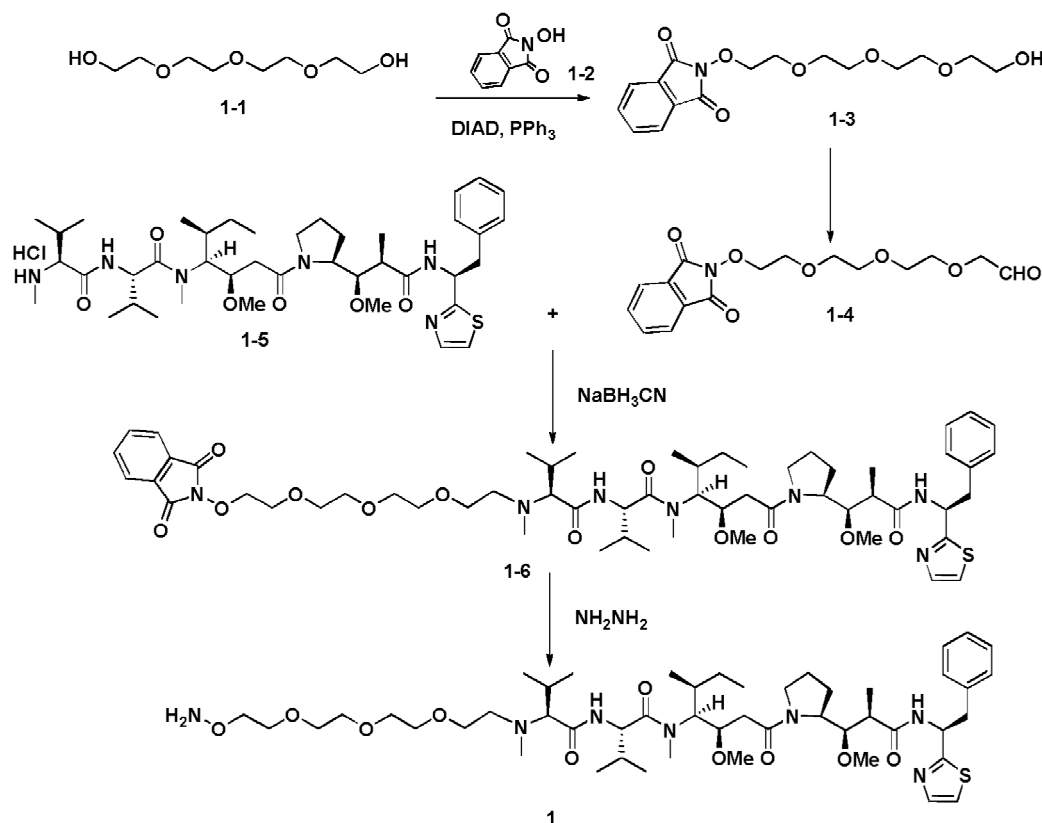
[0262] Los ejemplos no limitantes de nucleófilos no carbonados adecuados para el acoplamiento a electrófilos carbonados incluyen, pero no se limitan a aminas primarias y secundarias, tioles, tiolatos, y tioéteres, alcoholes, alcóxidos, azidas, semicarbazidas, y similares. Estos nucleófilos no carbonados, cuando se utilizan en conjunto con electrófilos de carbono, típicamente generan vínculos de heteroátomos (CXC), en los que X es un heteroátomo, incluyendo, pero no limitado a, oxígeno, azufre, o nitrógeno.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis del Compuesto 1

[0263]

Esquema 1



Compuesto 1-3: Tetra (etilenglicol) 1-1 (10 g, 51.5mmol), N-hidroxiftalimida 1-2 (8,4 g, 51,15mmol) y trifetilfosfina (17,6 g, 67mmol) se disolvieron en 300 ml de tetrahidrofurano seguido de adición de DIAD (12,8 ml, 61,78 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y después se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, dando 5,47 g (31%) del compuesto 1-3. Compuesto 1-4: A una solución del compuesto 1-3 (200 mg, 0,59 mmol) en 15 ml de diclorometano se añadió Dess-Martin Peiodinane (300 mg, 0,71 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se interrumpió con la solución de bisulfito de sodio en 15 ml de bicarbonato sódico saturado. La mezcla se separó. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna flash para dar 150 mg (75%) del compuesto 1-4.

Compuesto 1-6: A una solución de sal de hidrocloreuro de monometildolastatina 1-5 (50 mg, 0,062 mmol) en 1 ml de DMF se añadió el compuesto 1-4 (63 mg, 0.186mmol) y 70 µl de ácido acético, seguido de adición de 8 mg de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de

reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para producir 60 mg (80%) del compuesto 1-6. MS (ESI) m/z 547 [M + 2H], 1092 [M + H].

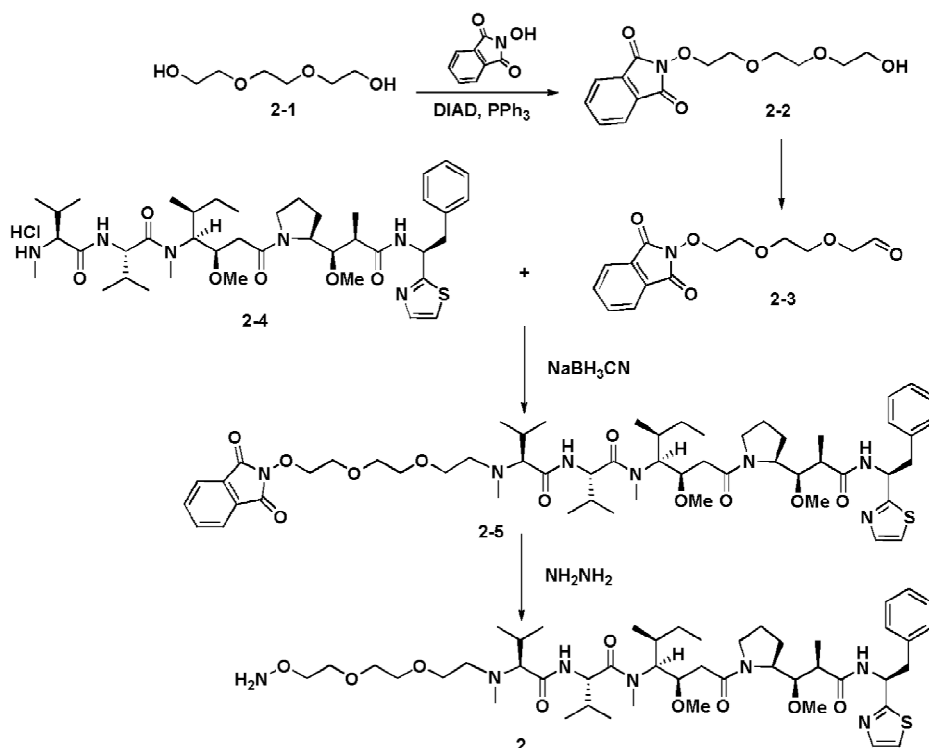
1d.

[0264] Compuesto 1: El compuesto 1-6 (60 mg, 0,05 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. 32 μ L de hidrazina se añadió. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de clorhidrato de 1N. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 33 mg (55%) del compuesto 1. MS (ESI) m/z 482 [M + 2H], 962 [M + H].

Ejemplo 2: Síntesis del compuesto 2

[0265]

Esquema 2

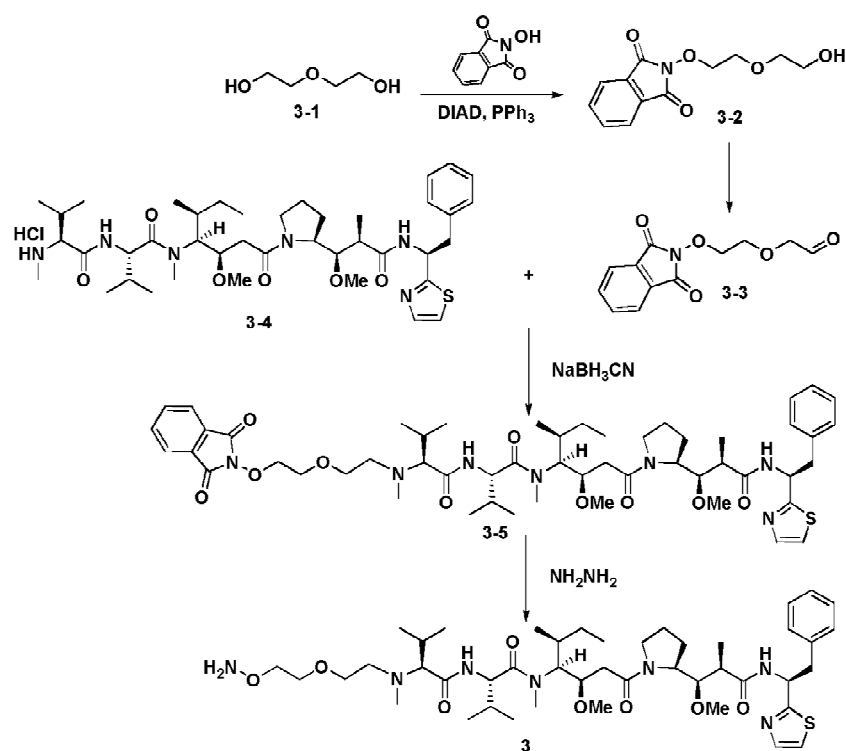


[0266] El Compuesto 2 se sintetizó a través de una ruta sintética similar a la descrita en el Ejemplo 1. MS (ESI) m/z 460 [M + 2H], 918 [M + H].

Ejemplo 3: Síntesis del Compuesto 3

[0267]

Esquema 3

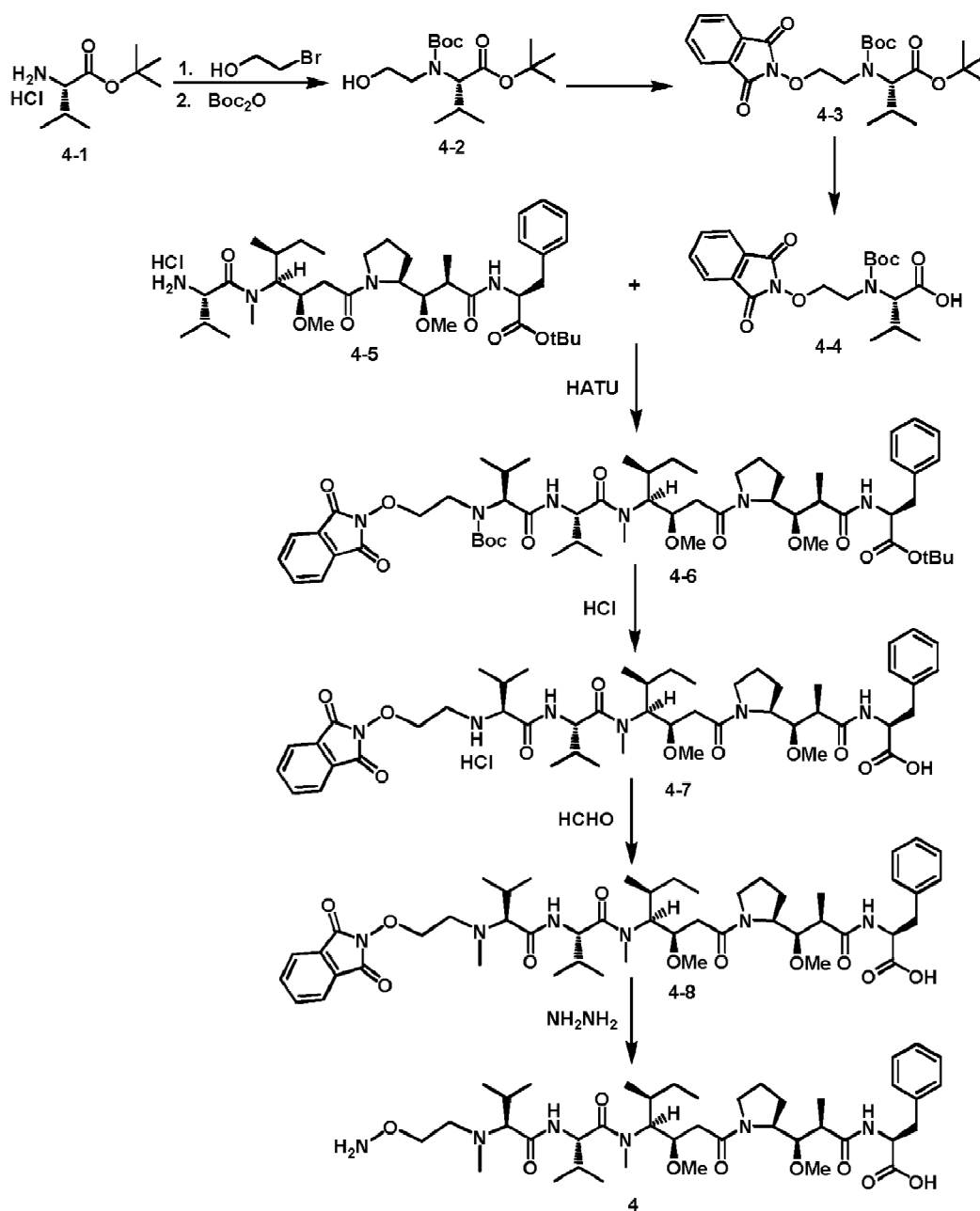


[0268] El compuesto 3 se sintetizó por la ruta sintética similar a la del Ejemplo 1. MS (ESI) m/z 438 [M + 2H], 974 [M + H].

Ejemplos 4 Síntesis del Compuesto 4

[0269] **Compuesto 4-2:** A una solución de Val (OtBu)-OH.HCl **4-1** (1 g, 4,77 mmol) y bromoetanol (304,7 µl, 4,3 mmol) en 10 ml de DMF se añadió 1,68 ml de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. 4,8 mmol de BoC₂O se añadió a la mezcla de reacción, seguido de 0,84 ml de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se concentró a vacío y se extrajo con acetato de etilo, y se lavó con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, dando 0,66 g del compuesto **4-2**.

Esquema 4



[0270] Compuesto 4-3: A una solución del compuesto 4-2 (500 mg, 1,58 mmol), N-hidroxifthalimida (261 mg, 1,6 mmol) y trifetilfosfina (538 mg, 2,05 mmol) en 15 ml de THF se añadió DIAD (394 µl, 1,9 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y después se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, dando 0,68 g del compuesto 4-3.

[0271] Compuesto 4-4: Compuesto 4-3 se disolvió en 15 ml de HCl 4 N/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en DMF y se trató con Boc₂O (230 µl, 1 mmol) y DIEA (352 µl, 2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para producir 100 mg del compuesto 4-4.

[0272] Compuesto 4-5: A una solución del compuesto Boc-Val-Dil-metiloDap-OH en DMF se añadió phe(OtBu)-OH.HCl, HATU y N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra a vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 mLx1, 50 mL x 2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra a vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido. El compuesto resultante se trata con HCl/EtOAc para dar el compuesto 4-5.

[0273] **Compuesto 4-6:** A una solución del compuesto **4-5** en DMF se añadió el compuesto **4-4**, HATU y DIEA. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra a vacío y se extrae con acetato de etilo (100 mLX1, 50 mL x 2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra a vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido para dar el compuesto **4-6**.

[0274] **Compuesto 4-7:** Compuesto **4-6** se disuelve en 15 ml de HCl 4 N/dioxano. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 Horas y se concentra a vacío para dar el compuesto **4-7**.

[0275] **Compuesto 4-8:** A una solución del compuesto **4-7** en 1 ml de DMF se añade formaldehído y ácido acético, seguido de la adición de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluye con agua y se purifica por HPLC para dar el compuesto **4-8**.

[0276] **Compuesto 4:** Compuesto **4-8** se disuelve en 1 ml de DMF. Se añade hidrazina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactiva con solución de clorhidrato de 1N. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el Compuesto **4**.

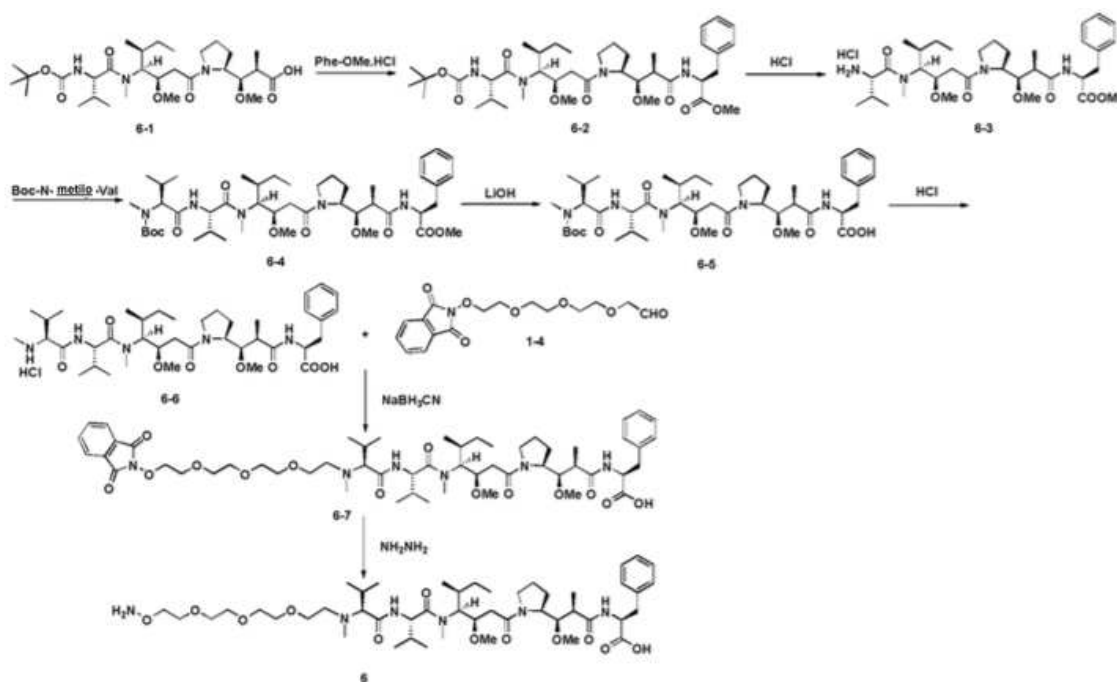
Ejemplo 5: Síntesis del Compuesto 5

[0277] El compuesto **4-7** se disuelve en 1 ml de DMF. Se añade hidrazina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactiva con solución de clorhidrato de 1N. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el Compuesto **5**.

Ejemplo 6: Síntesis del Compuesto 6

[0278]

Esquema 6



[0279] **Compuesto 6-2:** A una solución del compuesto **6-1** (500 mg, 0,875 mmol) en 3 ml de DMF se añadió 283 mg de clorhidrato de fenilalanina, 433mg de HATU y 581 µl de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró a vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 mLX1, 50 mL x 2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de flash para dar 560 mg (76%) del compuesto **6-2**.

[0280] **Compuesto 6-3:** Compuesto **6-2** se disolvió en 15 ml de HCl 4 N/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró a vacío para dar 511 mg del compuesto **6-3**.

[0281] **Compuesto 6-4:** A una solución del compuesto **6-3** (368 mg, 0,55 mmol) en 3 ml de DMF se añadió 255 mg

de valina Boc-N-metilo, 314 mg de HATU y 303 μ l de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró a vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 mLX1, 50 mL x 2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de flash para dar 370 mg (79%) del compuesto **6-4**.

[0282] Compuesto 6-5: A una solución del compuesto **6-4** (170 mg) en 10 mL de MeOH se añadió 5 eq de LiOH 1N. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó mediante 1NHCl y se extrajo con acetato de etilo lavado con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío para dar 150 mg (90%) del compuesto **6-5**.

[0283] Compuesto 6-6: Compuesto **6-5** se disolvió en HCl 4 N/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró en vacío y se purificó por HPLC para dar 150 mg del compuesto **6-6**.

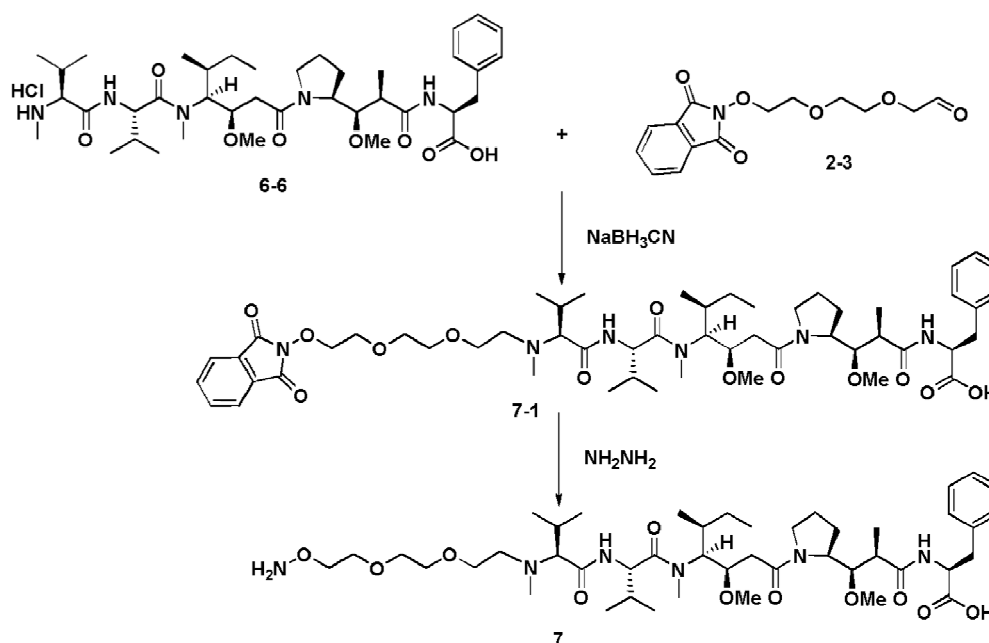
[0284] Compuesto 6-7: A una solución del compuesto **6-6** (50 mg, 0,062 mmol) en 1 mL de DMF se añadió el compuesto **1-4** (63 mg, 0,186mmol) y 70 μ l de ácido acético, seguido de la adición de 8 mg de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar 60 mg (80%) del compuesto **6-7**.

[0285] Compuesto 6: El compuesto **6-7** (60 mg, 0,05 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. 32 μ l de hidrazina se añadió. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de clorhidrato de 1N. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 33 mg (55%) del compuesto **6**.

Ejemplo 7 Síntesis del Compuesto 7

[0286]

Esquema 7

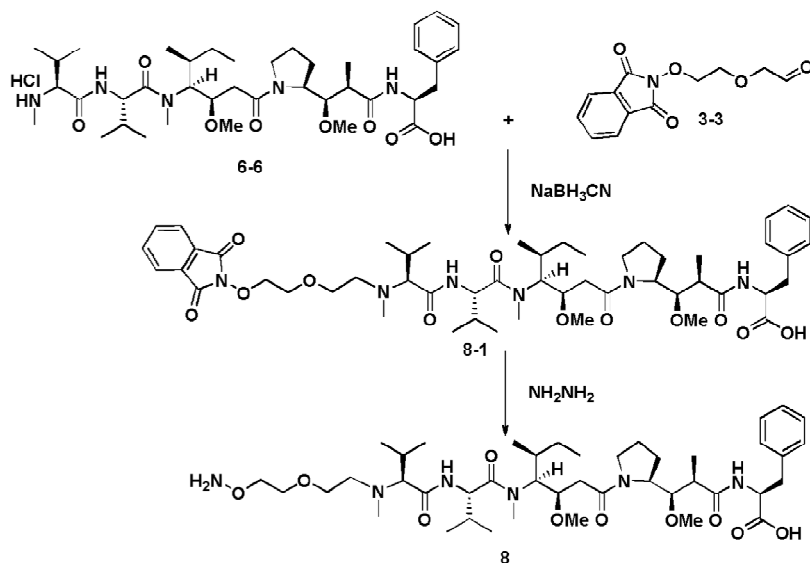


[0287] Compuesto **7** se sintetizó por la ruta sintética similar al compuesto **1**. MS (ESI) m/z 440 $[M + 2H]^+$, 879 $[M + H]^+$.

Ejemplo 8 Síntesis del Compuesto 8

[0288]

Esquema 8

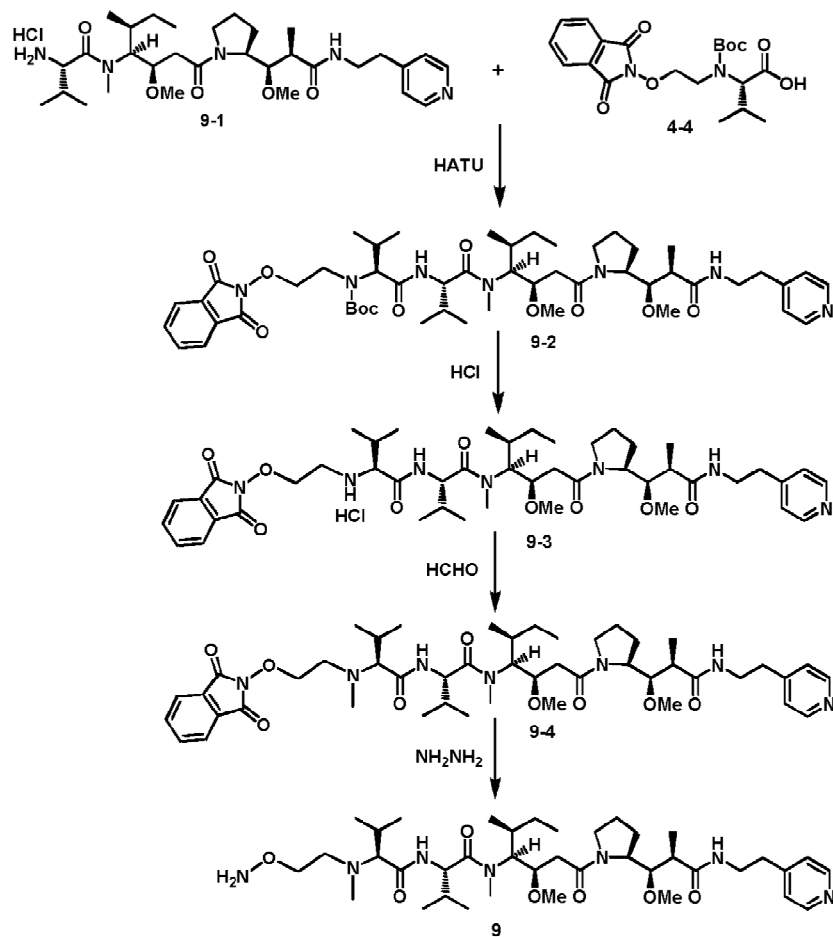


[0289] El compuesto 8 se sintetizó por la ruta sintética similar al compuesto 1. MS (ESI) m/z 418 $[\text{M} + 2\text{H}]$, 835 $[\text{M} + \text{H}]$.

Ejemplo 9 Síntesis del Compuesto 9

[0290]

Esquema 9



[0291] Compuesto 9-1: A una solución del compuesto Boc-Val-Dil-methylDap-OH en DMF se añade 4-(2-aminoetilo) piridina, HATU y N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra a vacío y se extrae con acetato de etilo (100 mLX1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra a vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía flash. El compuesto resultante se trata con HCl/EtOAc para dar el compuesto **9-1**.

[0292] Compuesto 9-2: Para una solución del compuesto **9-1** en DMF se añadió el compuesto **4-4**, HATU y DIEA. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra a vacío y se extrae con acetato de etilo (100 mLX1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra a vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido para dar el compuesto **9-2**.

[0293] Compuesto 9-3: Compuesto **9-2** se disuelve en 15 ml de HCl 4 N/dioxano. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentra a vacío para dar el compuesto **9-3**.

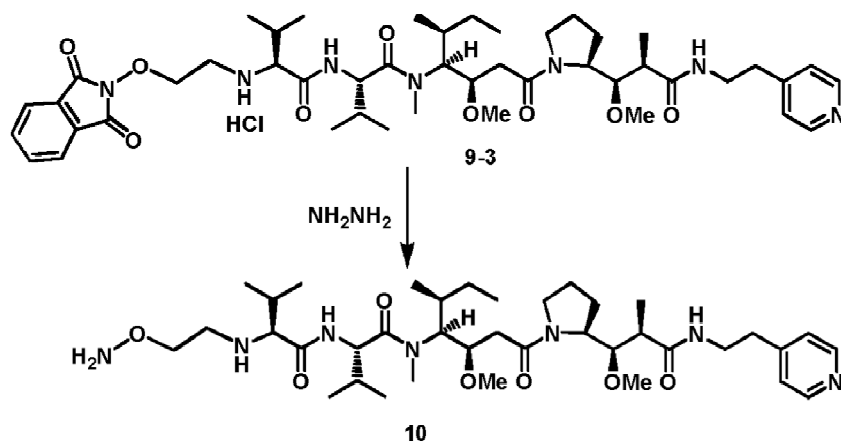
[0294] Compuesto 9-4: A una solución del compuesto **9-3** en 1 ml de DMF se añade formaldehído y ácido acético, seguido de la adición de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluye con agua y se purifica por HPLC para dar el compuesto **9-4**.

[0295] Compuesto 9: Compuesto **9-4** se disuelve en 1 ml de DMF. Se añade hidrazina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactiva con solución de clorhidrato de 1N. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el compuesto **9**.

Ejemplo 10: Síntesis del compuesto 10

[0296]

Esquema 10



[0297] Compuesto 10: Compuesto **9-3** se disuelve en 1 ml de DMF. Se añade hidrazina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de clorhidrato de 1N. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar el Ejemplo **10**.

Tabla 1. Estructuras de los compuestos 1-10

Ejemplo	Estructura
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Ejemplo 11: Análisis de unión de HER-tox de receptor HER2

[0298] HER2-Fc se inmovilizó sobre el chip CM5 a una densidad de ~ 280 RU. La tasa de flujo se ajustó a 50 ul/min con HBS-EP como tampón. Se inyectaron variantes HerTox durante 3 min con la fase de disociación 15. Pulso de 30 seg de 20 mM HCl se utilizó para regeneración. El modelo de analito bivalente se utilizó para ajustar los datos (Figura 1). El análisis de los datos indica que HerTox HA121-NC2D: Kd ~ 60 pM (chi2=4) y HerTox HA121-NC1D: Kd ~ 300 pM (chi2=14).

Ejemplo 12: Transfección transitoria

[0299] El cultivo de CHO-S se sembró a $0,75 \times 10^6$ /ml aproximadamente 16 horas antes de la transfección en medio FreeStyle Cho. Las células están listas para transfectar el día siguiente, cuando el recuento de células ha alcanzado $1,4 - 1,6 \times 10^6$ /mL. Cuando las células alcanzan la cuenta de destino, se añadió 400 FAP mM a una concentración final de cultivo de 1,4 mm. El complejo de ADN/PEI se prepara como se describe: ADN ($1,42 \text{ ug}/1 \times 10^6$ células) se disuelve en RPMI (5% (v) del volumen total del cultivo/v), se incubó la mezcla ADN/RPMI a temperatura ambiente durante 2 minutos, la reserva PEI (1 mg/ml) se añade a la solución de ADN en una proporción 3:1 (mL PEI/ug ADN), y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. El cultivo se añadió con cuidado a la mezcla y se arremolinó. Los matraces se transfieren a una incubadora a 32°C. Al día 6 tras la transfección, se realiza un análisis de transferencia Western. En el día 7 tras la transfección, se recoge el sobrenadante.

Ejemplo 13: Ensayo de expresión variante anti-HER2

[0300] 30 ml de cultivos de agitador, CHO-S en medio FreeStyle; se han usado 56 ug ADN en reactivo de PEI. También se utilizó 1,5 mM pAF. En el día 6, se recogió el sobrenadante. El título se determinó por Fc ELISA. (Figuras 2 y 3)

Ejemplo 14: Inhibición in vitro de ensayo de proliferación

[0301] En el día 1, se sembraron las células. El medio se aspiró y los matraces de cultivo T-225 de células se lavó con 30 ml de PBS - /-. PBS se aspiró y se añadió 6 ml de 0,25% de tripsina-EDTA a cada matraz. Los matraces se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 2-5 minutos. Las células adherentes fueron desalojadas golpeando el matraz y la tripsina se neutralizó mediante la adición de 14 ml de medio de cultivo. La suspensión de células se mezcló y transfirió a un tubo cónico de 50 mL. Las células se centrifugaron a 1200 rpm, 5 min, temperatura ambiente. El sedimento celular resultante se resuspendió en 12 ml de medio de cultivo. Las células se contaron en un hemocitómetro. Las células se sembraron a densidades de células apropiadas en 96 pocillos de fondo plano, placas claras y se incubaron durante la noche a 37°C, 5% de CO₂ para permitir que las células se unan. El volumen de chapado era de 80 uL/pocillo. 80 uL/pocillo de medio de cultivo se utilizó como el control "sin célula".

[0302] Ejemplos de densidad de cultivo celular incluyen:

BT474 (alta HER2) - 20.000 células/pocillo en F12K/DMEM (50/50), 10% de FBS, P/S MDA-MB-468 (HER2 negativo)- 6.000 células/pocillo en F12K/DMEM (50/50), 10% de FBS, P/S HCC1954 - 5.000 células/pocillo en RPMI 1640, 10% de FBS, P/S Skov-3 - 6.000 células/pocillo en RPMI 1640, 10% de FBS, P/S HT29 - 20.000 células/pocillo 5A de McCoy, 10% de FBS, P/S

[0303] En el día 2, se añadieron las muestras de ensayo a las células. Las muestras de ensayo se diluyeron en medio de cultivo a una concentración 9x de valores en la columna 2 de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Diluciones en serie 3x se hicieron a partir de la columna 2 a la columna 11 con una pipeta multicanal. 10 ul/pocillo de las muestras anteriores se añadió por duplicado a los pocillos apropiados de la placa de cabeza de serie. El volumen total de los pocillos estaba en torno a 90 uL/pocillo. Se añadió 10 ul/pocillo de medio de cultivo para evitar efectos de borde para pocillos de muestra. Los pocillos de control de medios se incluyeron en los pocillos interiores donde no se añadió ninguna muestra (solo 10 ul/pocillo de medio de cultivo) para utilizarse en los cálculos de proliferación. Las placas se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ durante 72 horas.

[0304] En el día 5, se produjo la proliferación de lectura. Para detectar la proliferación celular, se añadieron 10 ul/pocillo de reactivo WST-8 (Cell Counting Kit-8, cat # CK04-20, Dojindo Labs) a todos los pocillos. La placa se incubó durante 4 horas a 37°C, 5% de CO₂. Las placas se midieron para la absorbancia a OD 450 nm. El cálculo de la inhibición de la proliferación de muestras de ensayo: restar el valor OD450 "sin control celular" de los valores OD450 de todos los pocillos; calcular la media de los pocillos de control de medios (no tratados); calcular el % de valor de control de medios de cada muestra utilizando la fórmula: (muestra OD450/media OD450 % de control de medios) *100; calcular la media, desviación estándar, y %CV de valores de control de medios de % duplicado de cada muestra; trazar la muestra de % de cada muestra del valor de control de medios frente a la concentración de la muestra; calcular los valores de CI50 usando un análisis de regresión de ajuste de logística de 4 parámetros para determinar la potencia de las muestras de ensayo.

[0305] La Figura 4 y la Figura 5 ilustran los resultados del ensayo de proliferación in vitro con derivados enlazadores de dolastatina y la línea de cáncer de mama HCC1954, HER2 +++. Las Figuras 6 y 7 ilustran los resultados del ensayo de proliferación in vitro con derivados enlazadores de dolastatina y la línea de cáncer de ovario SKOV-3, HER2 +++. Las Figuras 8 y 9 ilustran los resultados del ensayo de proliferación in vitro con derivados enlazadores de dolastatina y la línea de cáncer de mama MDS-MB-468, HER2 negativo.

TABLA 2. HER-Tox Resumen de ensayo de proliferación: Valores Cl_{50} [nM] después de 72 horas de tratamiento con fármacos

Fecha de experimento	Conjunto de datos I								
	9/4/10	9/4/10	9/4/10	9/4/10	9/4/10	9/4/10	9/13/10	9/13/10	9/13/10
HER2 exp. (literatura/en casa)	+++/ +++	+++/ +++	?/+++	+++/ ++++	+++/ +++	+++/ ++++	+++/ +++	+++/ +++	?
Sensitividad in vivo a	+	+	-	?	-	?	+	-	?

Herceptina									
Muestra	BT474	HCC1954	LS513	NCI-N87	SKOV-3	ZR-75-30	BT474	SKOV-3	MDA-MB-175
Dolastatina	0,1	0,06	0,2	>30	0,2	>30	0,1	0,1	no ajuste
NC-D1	2,7	0,9	11	>100	3,7	>100	2,9	2,1	no ajuste
NC-D2	2,4	1,5	5,2	>100	3,4	>100	2,8	2,3	no ajuste
PHC-D2									
Herceptina	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Mab HA121-NC-D1	0,2	0,1	>10	>10	(0,04)*	>10	0,2	no ajuste	0,3
Mab HA121-NC-D2	1,0	0,3	>10	>10	0,3	>10	0,4	no ajuste	0,7
Mab HA121-PHC-D1									
Fab K136pAF	>10	>10	>10	>10	>10	>10			
Fab K136-NC-D1	1,8	0,5	>10	>10	2,5	>10			

Fecha de experimento	Conjunto de datos II				
	9/24/10	9/24/10	10/8/10	10/8/10	10/8/10
HER2 exp. (literatura/en casa)	++/?	+++/ +++	+++/ +++	+++/ +++	-/?
Sensitividad in vivo a Herceptina	no probable	+	+	-	?
Muestra	HT29	BT474	HCC1954	SKOV-3	MDA-MB-468
Dolastatina	4	2,5	0,04	0,2	<0,01
NC-D1	4	(45)*	<0,01	<0,1	<0,1
NC-D2	4	3	<0,01	(0,01)*	0,3
PHC-D2	12	7	2	8	2
Herceptina	>300	>300	>300	>300	>300
Mab HA121-NC-D1	>10	1	0,2	1,3	>30
Mab HA121-NC-D2	>10	0,8	0,03	(1,3)*	>30

ES 2 611 359 T3

Mab HA121- PHC-D2	5*	2	0,1	0,3	(5,8)*
Fab K136pAF					
Fab K136- NC-D1					

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 3. Datos celulares in vitro

Cancer	Línea de células	KRAS	BRAF	Expresión EGFR	Molécula pequeña, CI50, nM			ADC, CI50, nM		
					MMD	NC-D-1	C-D-1	NC-D-2	C225-NC-D-1	C225-NC-D-2
Piel	A431	wt	wt	+++	0,1	8,22	16,54		0,09	0,12
Colon	Colo 205	wt	mut	+	0,25	6,81	40,03		>100	>100
	HCT-116	mut	wt	++	0,13	2,14	24,86	5,7	51,73	>100
	HT-29	wt	mut	++	0,1	4,3		1,7	36,9	16,7
	SW620	mut	wt	-	0,14	5		3,2	121	56,8
Pulmón	HCT -15	mut	wt	++	2,65	31,03	>100	>100	>300	>300
	A549*	mut	wt	++	0,19	6,44	39,82	39,82	>100	>100
	H2122	mut	wt	+	0,11	12,71	31,76	31,76	>100	>100
	H460	mut	wt	+	0,48	10,4	95,1	95,1	>300	>300
Próstata	DU145	wt	wt	++	0,24	4,8	20,51	20,51	>100	>100

Ejemplo 15: Eficacia anti-tumor in vivo de HER2-ADC en HCC1954 (carcinoma de mama humano) modelo animal de xenoinjerto

[0306] Células HCC1954 (carcinoma de mama humano) se obtuvieron de American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se cultivaron en RPMI + 10% de FBS, 37°C, 5% de CO₂ hasta 80% de confluencia. Las células se recogieron por tripsinización y se suspendieron en PBS a 1×10^8 células/ml.

[0307] Mujer, ratones SCID-beige, 5-8 semanas de edad, se obtuvieron de Charles River Laboratories. Células HCC1954 (humanas, carcinoma de mama, ATCC, # CRL-2338) se mezclaron 1: 1 con Matrigel (BD Biosciences, Bedford MA) y se inyectaron por vía subcutánea en los ratones. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de 100 a 200 mm³, los ratones se clasificaron en grupos de 9-10 ratones cada uno. Mediciones Caliper se tomaron dos veces por semana hasta el final del estudio. Para estimar el volumen del tumor, dos diámetros ortogonales se midieron con calibradores y los valores introducidos en la fórmula, $(L \times W \times W)/2 = V$, (donde W=el diámetro más corto, L=el diámetro más largo y V=volumen), para obtener un volumen estimado. El volumen del tumor se convierte en el peso del tumor en el archivo de datos de Excel asumiendo $1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$. El punto de llegada se basó en un diseño de estudio de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI). Cuando el volumen medio del tumor del grupo control alcanzó aprox. 1.000 mm³ todos los ratones fueron sacrificados o el día 28, lo que ocurriera primero.

[0308] Los ratones recibieron una única inyección intravenosa (vena de la cola) en día 1 de la dosificación. Artículo de prueba se disolvió en 4 mg/ml, 2 mg/ml y 0,66 mg/ml y se administró en un volumen de dosis de 5 ml/kg para entregar 20, 10 y 3,3 mg/kg. Los artículos de ensayo fueron: Herceptina® grado clínico (Trastuzumab), Her2-HS122-NCD1 (Ab: relación de fármacos=1: 2, enlazador no escindible), y Her2-HS122/LK145-HCD1 (Ab: relación de fármacos=1: 4, enlazador escindible) Véase Figura 16.

Ejemplo 16: Estudios in vivo de Derivado vinculado a Her2-Dolastatina

[0309] Se utilizaron células HCC1954 para este estudio con 10^7 células/ratón en Matrigel, SC en el flanco derecho. Los ratones fueron SCID-bg hembra de 4-8 semanas. Agrupación se realizó en el día 5 después de la implantación celular (tumores ~ 100 mm³): clasificada en 11 grupos de 10 ratones cada uno. Una sola dosis IV se dio el día 1 de la dosificación con cada compuesto a los 3 niveles de dosis, 20 mg/kg, 10 mg/kg y 3,3 mg/kg. El volumen del tumor se monitorizó hasta que se alcanzó el punto final (1.000 mm³ o 60 días). (Figura 10) Paclitaxel 25 mg/kg, IV, QOD x 5 se empleó como la quimioterapia de control. El vehículo = 50 mM histamina, 0,1 M NaCl, 5% de trehalosa, pH 6. Herceptin® de grado clínico (Trastuzumab), Her2-HS122-NCD1 (enlazador no escindible) y Her2-HS122/LK145-HCD1 (enlazador escindible) se pusieron a prueba. (Figuras 11 y 12)

Tabla 4. Cálculo de T/C (tratado/control) para el estudio HCC1954 en día 28

Grupo	n	Régimen de tratamiento 1				Volumen de tumor mediano (mm ³)	T/C
		Agente	mg/kg	Ruta	Programación		
1#	10	vehículo	-	iv	qd x 1	486	--
2	10	trastuzumab	3,3	iv	qd x 1	405	0.833
3	10	trastuzumab	10	iv	qd x 1	446	0.918
4	10	trastuzumab	20	iv	qd x 1	385	0.792
5	10	Su-HS122-NC1D-002	3.3	iv	qd x 1	40	0.082
6	10	Su-HS122-NC1D-002	10	iv	qd x 1	14	0.029
7	10	Su-HS122-NC1D-002	20	iv	qd x 1	18	0.037
8	10	Su-HS122/LK145-HC1D-001	3.3	iv	qd x 1	40	0.082
9	10	Su-HS122/LK145-HC1D-001	10	iv	qd x 1	25	0.051
10	10	Su-HS122/LK145-HC1D-001	20	iv	qd x 1	18	0.037
11	10	paclitaxel	25	iv	qod x 5	18	0.037

Ejemplo 17: Estudios farmacocinéticos

[0310] Un ensayo se realizó que detectó la unión del anticuerpo al receptor de ErbB2. (Figura 13). Un ensayo se realizó que detectó al menos dos dolastatinas vinculadas a un anticuerpo (Figura 14).

Figura 15.

Ejemplo 18: El tratamiento para el cáncer de mama

[0311] El estudio clínico humano de la seguridad y/o eficacia de derivado de dolastatina vinculado a trastuzumab para la terapia del cáncer de mama.

[0312] Objetivo: Comparar la seguridad y la farmacocinética de la composición administrada que comprenden el derivado de dolastatina vinculado a trastuzumab.

[0313] Diseño del estudio: Este estudio será un ensayo de fase I, de centro único, de etiqueta abierta, estudio de escalado de dosis aleatorizada seguido de un estudio de fase II en pacientes con cáncer de mama. Los pacientes no deben haber tenido una exposición al derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab con anterioridad a la entrada de estudio. Los pacientes no deben haber recibido tratamiento para su cáncer dentro de 2 semanas de comenzar el ensayo. Los tratamientos incluyen el uso de quimioterapia, factores de crecimiento hematopoyéticos, y terapia biológica tales como anticuerpos monoclonales. Los pacientes deben haber recuperado de todas las toxicidades (a grado 0 o 1) asociadas con el tratamiento anterior. Todos los sujetos se evalúan para determinar la seguridad y todas las extracciones de sangre para el análisis farmacocinético se recogieron del modo previsto. Todos los estudios se llevan a cabo con la aprobación del comité de ética institucional y el consentimiento del paciente.

Fase I: Los pacientes reciben derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab i.v. en los días 1, 8 y 15 de cada ciclo de 28 días. Las dosis de derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab puede mantenerse o modificarse en cuanto a toxicidad sobre la base de evaluaciones como se indica a continuación. El tratamiento se repite cada 28 días en ausencia de toxicidad inaceptable. Cohortes de 3 a 6 pacientes reciben dosis crecientes del derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab hasta que se determine la dosis máxima tolerada (MTD) para derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab. La MTD se define como la dosis anterior a aquella en que 2 de 3 o 2 de 6 pacientes experimentan una toxicidad limitante de la dosis. Toxicidades limitantes de la dosis se determinan de acuerdo con las definiciones y normas establecidas por el Instituto Nacional del Cáncer (INC) Common Terminology for Adverse Events (CTCAE) Versión 3.0 (9 de agosto, 2006).

Fase II: Los pacientes que reciben derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab como en la fase I a la DMT determinada en la fase I. El tratamiento se repite cada 4 semanas durante 2 a 6 cursos en la ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. Tras la finalización de 2 ciclos de terapia de estudio, los pacientes que logran una respuesta completa o parcial puede recibir 4 cursos adicionales. Los pacientes que mantienen la enfermedad estable durante más de 2 meses después de la finalización de 6 ciclos de tratamiento del estudio puede recibir 6 cursos adicionales en el momento de la progresión de la enfermedad, siempre que cumplan con los criterios de elegibilidad originales.

[0314] La sangre de serie de muestras de sangre se extrae por punción venosa directa antes y después de la administración de derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab. Muestras de sangre venosa (5 ml) para la determinación de las concentraciones en suero se obtienen en alrededor de 10 minutos antes de la dosificación y a aproximadamente los siguientes tiempos después de la dosificación: días 1, 8, y 15. Cada muestra de suero se dividió en dos alícuotas. Todas las muestras de suero se almacenaron a -20°C. Las muestras de suero se envían en hielo seco.

[0315] Farmacocinética: Los pacientes que se someten a la recogida de muestras de plasma/suero para la evaluación farmacocinética antes de comenzar el tratamiento y en los días 1, 8 y 15. Los parámetros farmacocinéticos se calculan por métodos independientes de modelo en un sistema informático Digital Equipment Corporation VAX 8600 usando la versión más reciente del software BIOAVL. Los siguientes parámetros farmacocinéticos se determinaron: la concentración sérica máxima (C_{max}); tiempo hasta la concentración máxima sérica (t_{max}); área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC) desde el tiempo cero hasta el tiempo de muestreo de última sangre (AUC_{0-72}) calculada con el uso de la regla trapezoidal lineal; y la eliminación de la vida media terminal ($t_{1/2}$), calculado a partir de la velocidad constante de eliminación. La velocidad constante de eliminación se estimó por regresión lineal de puntos de datos consecutivos en la región lineal terminal de la trama de concentración-tiempo log-lineal. La media, la desviación estándar (DE), y el coeficiente de variación (CV) de los parámetros farmacocinéticos se calculan para cada tratamiento. Se calcula la relación de los medios de los parámetros (formulación conservada/formulación no conservada).

[0316] La respuesta del paciente a la terapia de combinación: La respuesta del paciente se evaluó a través de imágenes con rayos X, tomografía computarizada y la resonancia magnética, y la imagen se lleva a cabo antes de comenzar el estudio y al final del primer ciclo, con imágenes adicionales llevadas a cabo cada cuatro semanas o al final de los ciclos posteriores. Las modalidades de imágenes se eligen basándose en el tipo de cáncer y la viabilidad/disponibilidad, y la misma modalidad de imagen se utiliza para tipos de cáncer similares, así como a lo largo del curso de estudio de cada paciente. Las tasas de respuesta se determinan mediante los criterios RECIST.

(Therasse et al, J. Natl Cancer Inst 2000 2 de febrero; 92(3):205-16; <http://ctep.cancer.gov/forms/TherasseRECISTJNCI.pdf>). Los pacientes también se someten a biopsia cancer/tumor para evaluar los cambios en el fenotipo de células progenitoras del cáncer y el crecimiento clonogénico por citometría de flujo, transferencia Western, y IHC, y para cambios en la citogenética por FISH. Después de la terminación del tratamiento del estudio, los pacientes son seguidos periódicamente durante 4 semanas.

Ejemplo 19: El tratamiento para el cáncer de mama

[0317] El estudio clínico humano de la seguridad y eficacia de derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab de terapia de Cáncer de Mama

[0318] Objetivo: Comparar la eficacia y toxicidad de derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab solo seguido de la progresión de la enfermedad mediante la combinación de trastuzumab y paclitaxel vs trastuzumab de combinación de primera línea y paclitaxel en mujeres con cáncer de mama metastásico con sobreexpresión de HER2.

[0319] Diseño del estudio: Este estudio es un estudio aleatorizado, multicéntrico. Los pacientes se estratifican según el grado de HER2/ sobreexpresión neu (2+ vs 3+), el tratamiento adyuvante con antraciclinas (sin tratamiento previo frente a un tratamiento previo sin radioterapia a la pared torácica izquierda frente a tratamiento previo con radioterapia a la pared torácica izquierda), el estado del receptor de estrógeno (positivo vs negativo vs desconocido), la terapia previa (primera línea frente a la segunda/tercera línea), y el centro. Los pacientes se asignaron al azar a uno de dos grupos de tratamiento. Brazo I: Los pacientes que reciben derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab IV sobre 30-90 minutos a la semana. Al momento de la progresión de la enfermedad, los pacientes reciben la combinación de derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab IV y paclitaxel IV como en el brazo II. Brazo II: Los pacientes que reciben derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab IV sobre 30-90 minutos a la semana. El paclitaxel se administra por vía intravenosa durante 1 hora semanal durante 3 semanas seguidas de 1 semana de descanso.

[0320] El tratamiento continúa en ambos brazos en la ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. La calidad de vida se evaluó al inicio del estudio y el día 1 de cursos 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, y 12. Los pacientes son seguidos a los 1, 3 y 6 meses y después cada 6 meses a partir de entonces.

Ejemplo 20: El tratamiento para el cáncer de vejiga

[0321] El estudio clínico humano de la seguridad y eficacia de un derivado de dolastatina descrito en este documento para la terapia del cáncer de vejiga.

[0322] Objetivo: Determinar la toxicidad aguda de paclitaxel y radioterapia con o sin derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab en pacientes que se han sometido resección previa de vejiga transuretral para el carcinoma celular transicional con invasión muscular de la vejiga.

[0323] Características de la enfermedad: Histológicamente o citológicamente se confirma carcinoma celular transicional primario (TCC) de la vejiga; evidencia histológica de invasión muscular propia; cumple 1 de los siguientes criterios de etapas: etapa T2-4a; NX, N0 o N1; y la enfermedad M0 o etapa clínica T1, enfermedad de grado 3/3 y requiere terapia local definitiva; la afectación tumoral de la uretra prostática autorizada a condición de que se cumplan los siguientes criterios: el tumor se resecó de modo completamente visible; sin evidencia de invasión del estroma de la próstata, no hay evidencia de metástasis a distancia por radiografía de tórax o una tomografía computarizada y exploración abdominal/pélvica CT; se ha sometido a una resección transuretral de la vejiga (tan completa como sea posible con seguridad) en las últimas 3 a 8 semanas, incluyendo el examen bimanual con el mapeo del tumor; suficiente tejido tumoral disponible para el análisis del HER2/neu; no es un candidato para la cistectomía radical.

[0324] Diseño del estudio: Este estudio es un estudio no aleatorizado, multicéntrico. Los pacientes son asignados a 1 de 2 grupos de tratamiento de acuerdo con el estado de HER2/neu (HER2/neu 2+ o 3+ tinción [group 1] frente a HER2/neu 0 ó 1+ tinción [Grupo 2]).

Grupo 1: Los pacientes reciben paclitaxel IV durante 1 hora en los días 1, 8, 15, 22, 29, 36, y 43 y derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab IV más de 90 minutos en el día 1 y después más de 30 minutos en los días 8, 15, 22, 29, 36, y 43. Los pacientes también se someten a radioterapia una vez al día en los días 1-5, 8-12, 15-19, 22-26, 29-33, 36-40, 43-47 y 50. El tratamiento continúa en la ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable.

Grupo 2: Los pacientes reciben paclitaxel y se someten a radioterapia como en el grupo 1. Después de la terminación del tratamiento del estudio, los pacientes son seguidos en 4 a 5 semanas, cada 3 meses durante 1 año, cada 4 meses durante 1 año, cada 6 meses durante 3 años, y posteriormente cada año.

Ejemplo 21: El tratamiento para el cáncer ovárico

[0325] El estudio clínico humano de la seguridad y eficacia de derivados de dolastatina que se describen en este documento para terapia de cáncer ovárico.

5 **[0326]** Objetivo: Evaluar la seguridad y eficacia de una dosis IV de cuatro semanas una vez a la semana de la composición que comprende un derivado de dolastatina se describe en este documento en mujeres con cáncer de ovario de HER2 sobreexpresado.

10 **[0327]** Diseño del estudio: Este estudio es un estudio no aleatorio, de etiqueta abierta, de 11 semanas, multicéntrico. Este estudio evaluará el perfil de seguridad de cuatro dosis IV una vez por semana, la DMT, PK y la inmunogenicidad de un derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab. Los pacientes son asignados a un único grupo. Los pacientes reciben una dosis de derivado de dolastatina vinculado a trastuzumab una vez a la semana durante 4 semanas. El derivado de dolastatina vinculado a trastuzumab será administrado por vía intravenosa en días de estudio 1, 8, 15 y 22. Las muestras de orina se realizarán en los días 1 y 22.

15 **[0328]** La sangre de serie de muestras de sangre se extrae por punción venosa directa antes y después de la administración del derivado de dolastatina vinculada a trastuzumab. Muestras de sangre venosa (5 ml) para la determinación de las concentraciones en suero se obtienen en alrededor de 10 minutos antes de la dosificación y a aproximadamente los siguientes tiempos después de la dosificación: días 1, 2, 4, 5, 8, 15, 22, 36, 43 y 50. Cada muestra de suero se dividió en dos alícuotas. Todas las muestras de suero se almacenaron a -20°C. Las muestras de suero se envían en hielo seco.

20 **[0329]** El tratamiento continúa en la ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. La calidad de vida se evaluó al inicio del estudio y el día 1 de cursos de 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, y 12. Los pacientes son seguidos en los días 29, 36, 43 y 50. Se pedirá a los pacientes acerca de los eventos adversos. Los pacientes tendrán un estudio por imágenes y ECG para evaluar el tamaño de tumor y la función del corazón (día 43). A la terminación de los pacientes del estudio tendrán un día de examen físico (50). Los pacientes con pruebas de regresión de la enfermedad pueden recibir terapia continuada hasta que se documente evidencia de progresión de la enfermedad.

30

35

40

45

50

55

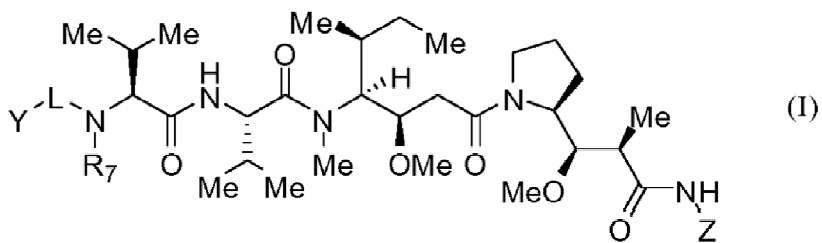
60

65

Reivindicaciones

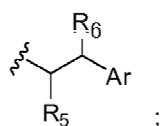
1. Un compuesto de:

(I) Fórmula (I):



donde:

Z tiene la estructura de:

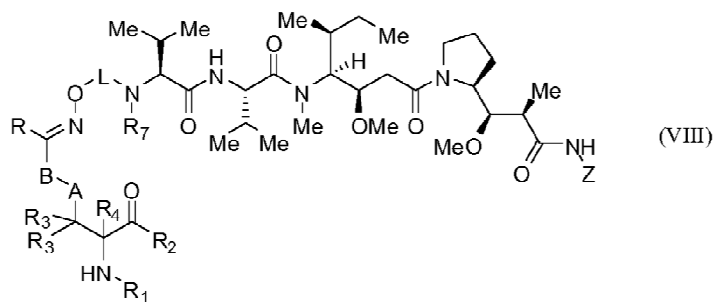


R₅ es H, COR⁸, C₁-C₆ alquilo, o tiazol;
R⁸ es OH;
R₆ es OH o H;
Ar es fenilo o piridina;

R₇ es C₁-C₆ alquilo o hidrógeno;
Y se selecciona del grupo que consiste de una hidroxilamina;
L es -alquilenos o -(alquilenos-O)_n-alquilenos-; y
n es un número entero mayor que o igual a uno;

o una sal del mismo;

(ii) Fórmula (VIII):

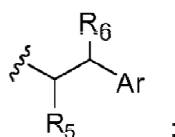


donde:

A es opcional y, cuando está presente es alquilenos inferior, alquilenos sustituido inferior, cicloalquilenos, cicloalquilenos sustituido inferior, alquilenos, alquilenos sustituido inferior, alquilenos, heteroalquilenos inferior, heteroalquilenos sustituido, heterocicloalquilenos inferior, heterocicloalquilenos inferior sustituido, arilenos, arilenos sustituido, heteroarilenos, heteroarilenos sustituido, alcarilenos, alcarilenos sustituido, aralquilenos o aralquilenos sustituido;

B es opcional y, cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior, alquilenos sustituido inferior, heteroalquilenos,

heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O- (alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector de amino, resina, al menos un aminoácido, polipéptido o polinucleótido; R₂ es OH, un grupo protector de éster, resina, al menos un aminoácido, polipéptido o polinucleótido; R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; Z tiene la estructura de:

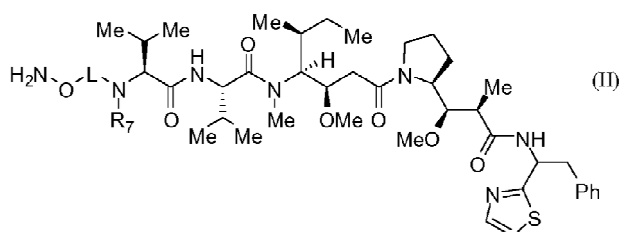


R₅ es H, COR⁸, C₁-C₆ alquilo, o tiazol; R⁸ es OH;
R₆ es OH o H;
Ar es fenilo o piridina;

R₇ es C₁-C₆ alquilo o hidrógeno; y
L es -alquileo- o - (alquileo-O)_n-alquileo-; y
n es un número entero mayor que o igual a uno;

o un solvato del mismo;
donde el alquilo es una cadena lineal o ramificada, o radical de hidrocarburo cíclico, o combinación de los mismos, la cual puede estar totalmente saturada, mono- o poliinsaturada y puede incluir radicales di- y multivalentes y también incluye heteroalquilo y haloalquilo; alquileo incluye heteroalquileo; y arilo incluye heteroarilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1 (i), que comprende la fórmula (II):



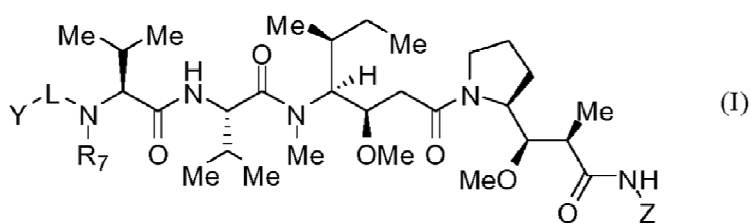
3. El compuesto de la reivindicación 1 parte (ii) en el que R₁ es un polipéptido.

4. El compuesto de la reivindicación 1 parte (ii) en el que R₂ es un polipéptido.

5. El compuesto de las reivindicaciones 3 o 4, en el que el polipéptido es un anticuerpo.

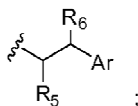
6. El compuesto de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es trastuzumab.

7. Un método para la derivatización de un análogo de dolastatina que comprende la fórmula (I), el método comprende poner en contacto el análogo de dolastatina con un reactivo de fórmula (XXXVII), en el que la Fórmula (I) corresponde a:



donde:

Z tiene la estructura de:



R_5 es H, COR⁸ C₁-C₆ alquilo, o tiazol;

R^8 es OH;

R_6 es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

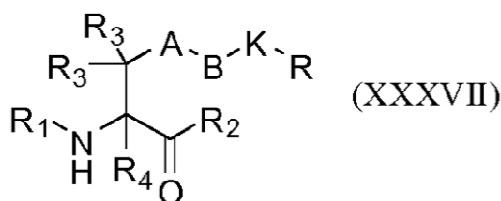
R_7 es C₁-C₆ alquilo o hidrógeno;

Y es NH₂-O-;

L es-alquilenos o -(alquilenos-O)_n-alquilenos;

n es un número entero mayor que o igual a uno;

donde la fórmula (XXXVII) corresponde a:

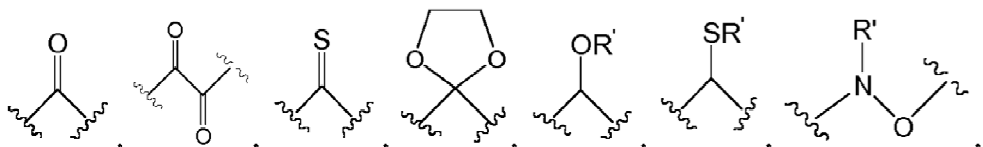


donde:

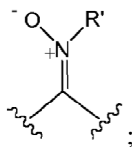
A es opcional y, cuando está presente es alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquilenos, o aralquilenos sustituido;

B es opcional y, cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, -O-, -O- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -S-, -S- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')CO- (alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R') C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

K es



o



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

R₁ es H, un grupo protector de amino, resina, al menos un aminoácido, o polinucleótido;

R₂ es OH, un grupo protector de éster, resina, al menos un aminoácido, o polinucleótido; y

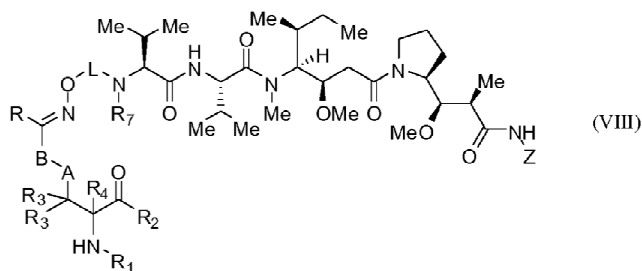
R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

en donde el alquilo es una cadena lineal o ramificada, o radical de hidrocarburo cíclico, o combinación de los mismos, que puede estar totalmente saturado, mono- o poliinsaturado y puede incluir radicales di- y multivalentes y también incluye heteroalquilo y haloalquilo;

alquileno incluye heteroalquileno; y

arilo incluye heteroarilo.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el análogo de dolastatina derivatizado comprende al menos una oxima que contiene aminoácido que tiene la estructura de Fórmula (VIII):



9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o aglutinante.

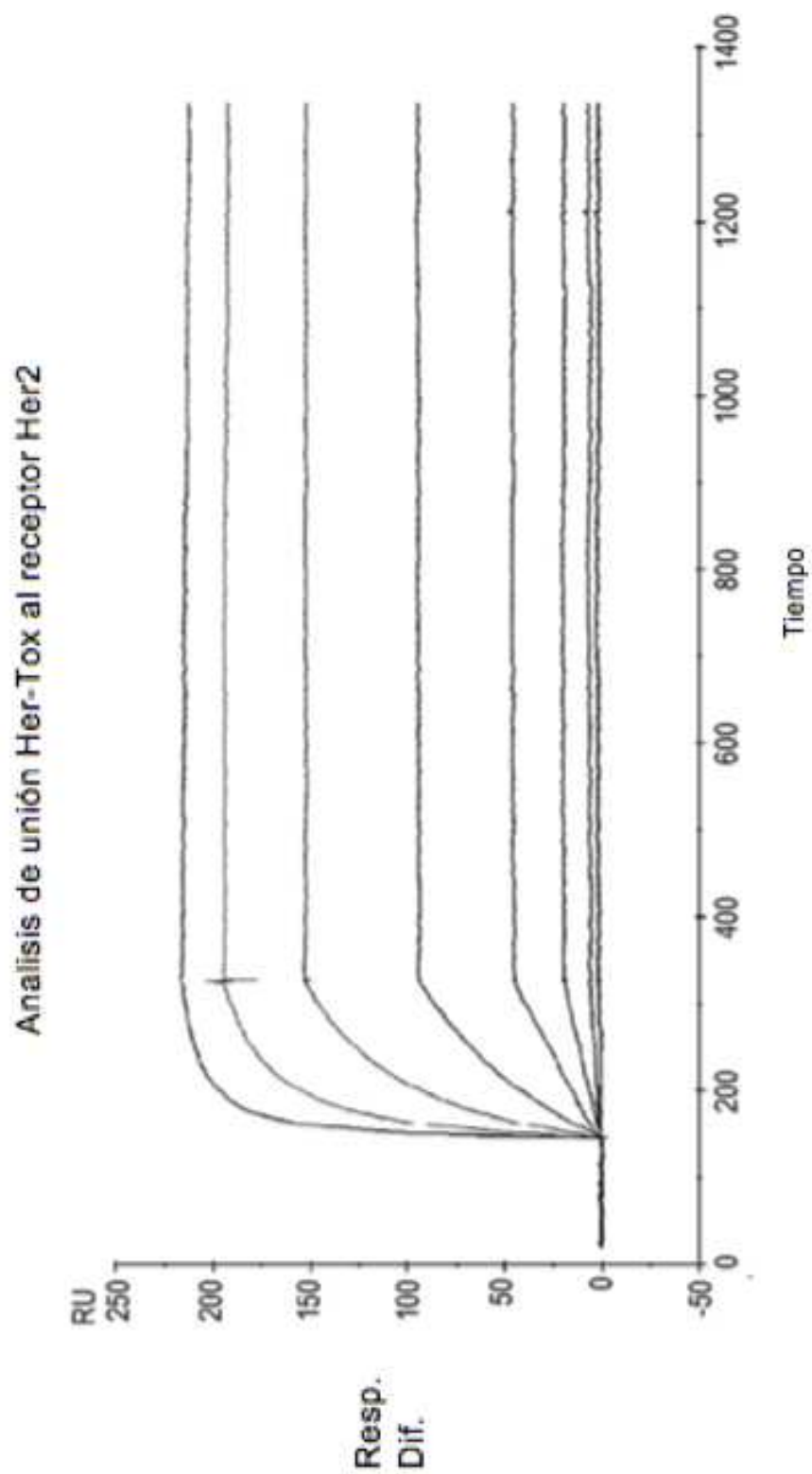


FIG. 1

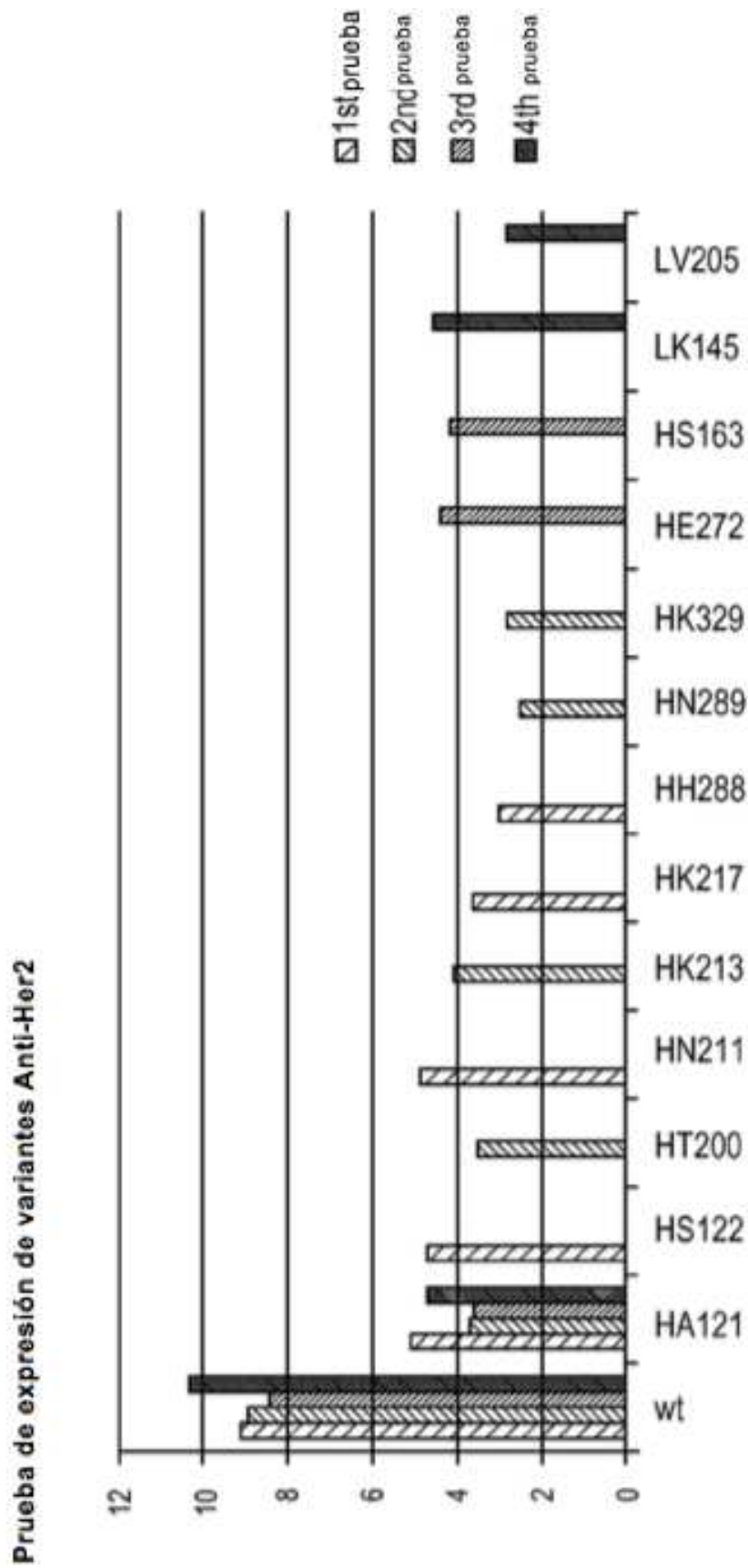


FIG. 2

Prueba de expresión de variantes Anti-Her2

Expresión de variantes Anti-Her2

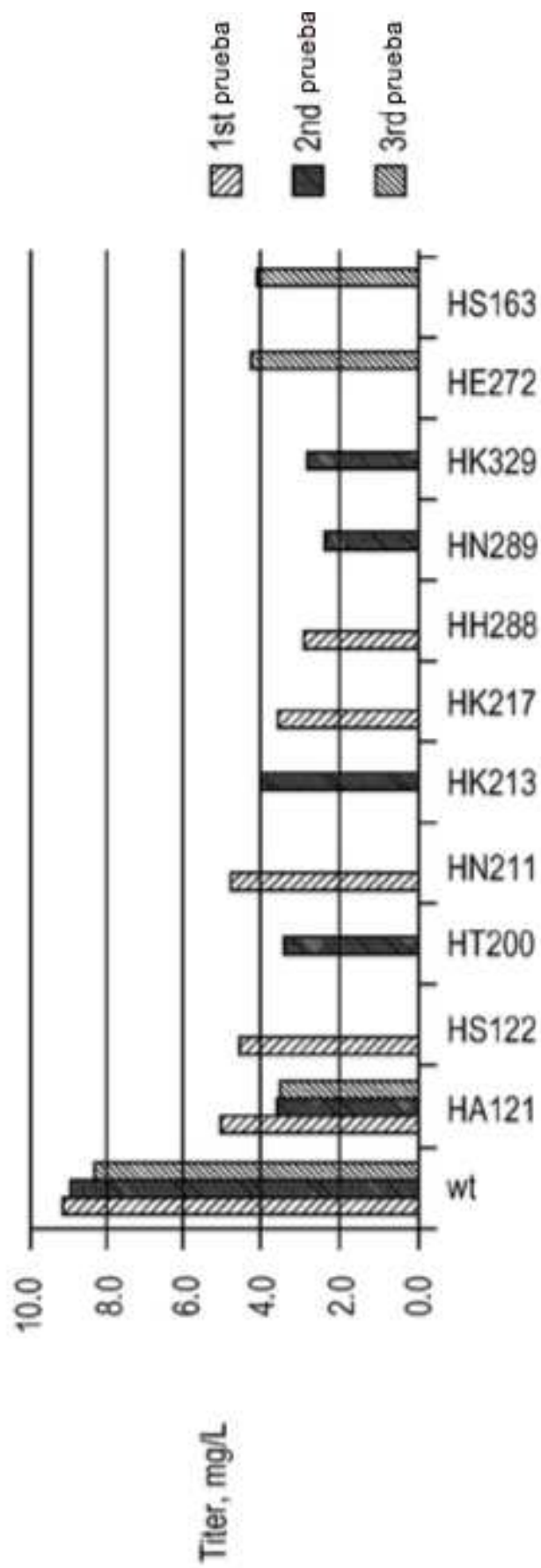


FIG. 3

Ensayo de proliferación con línea de cancer de mama HCC 1954 y derivado enlazador de dolastatina

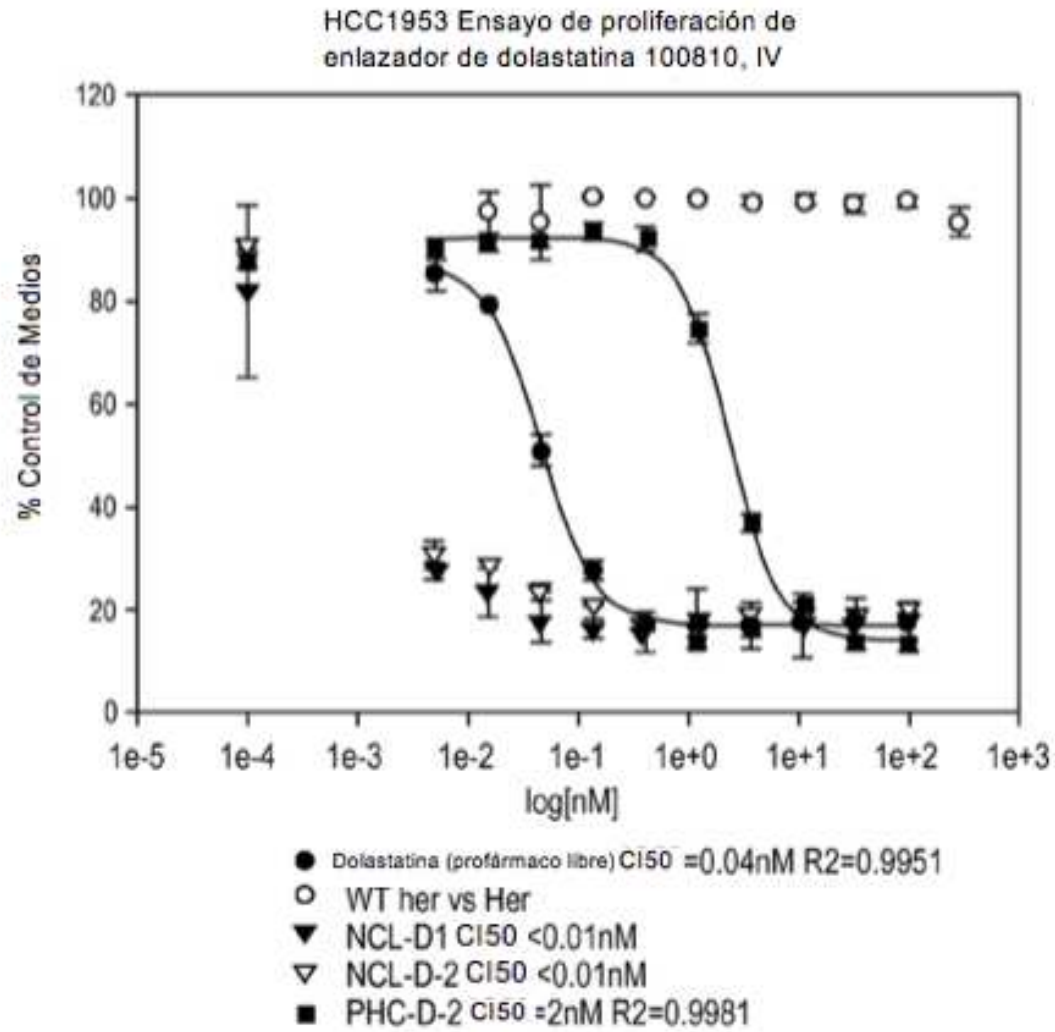


FIG. 4

Ensayo de proliferación con línea de cancer de mama HCC 1954 y conjugados de Her-tox

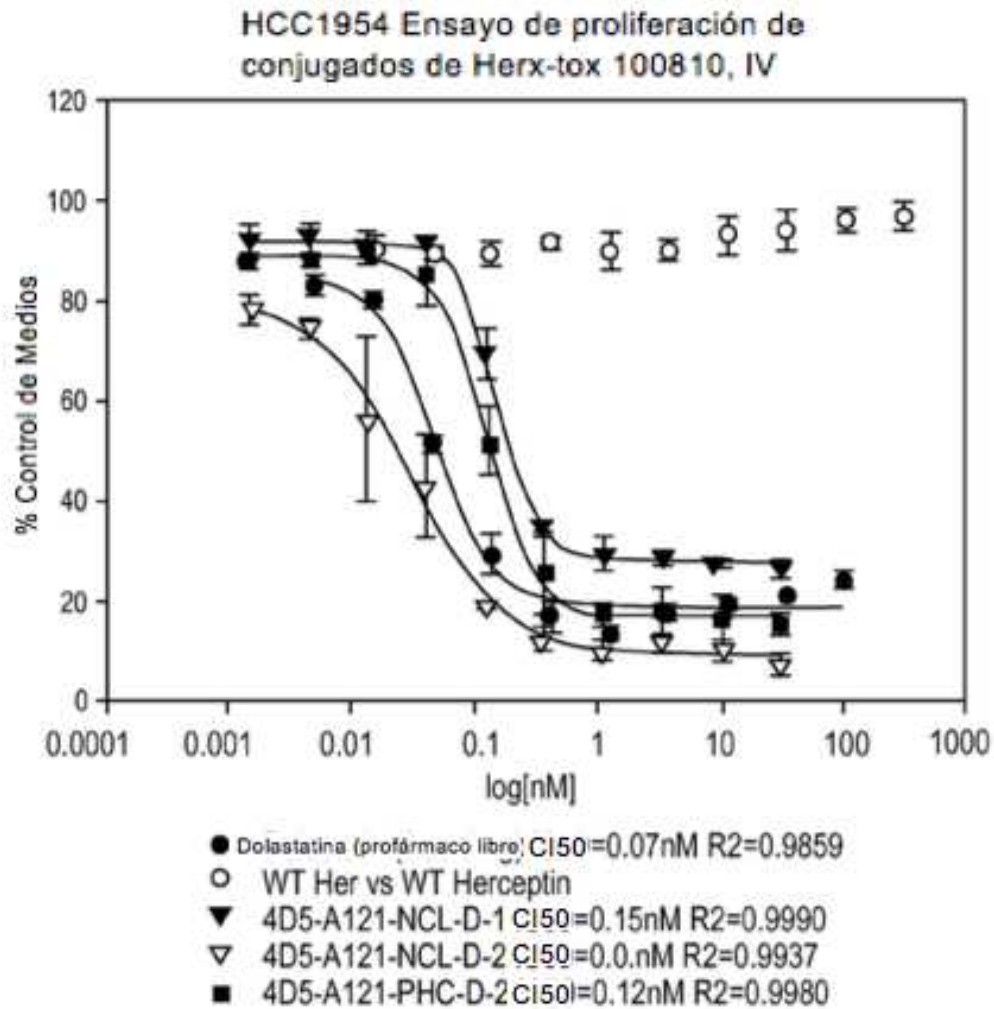


FIG. 5

Ensayo de proliferación con línea de cancer ovárico SKOV-3 y derivados enlazadores de dolastatina

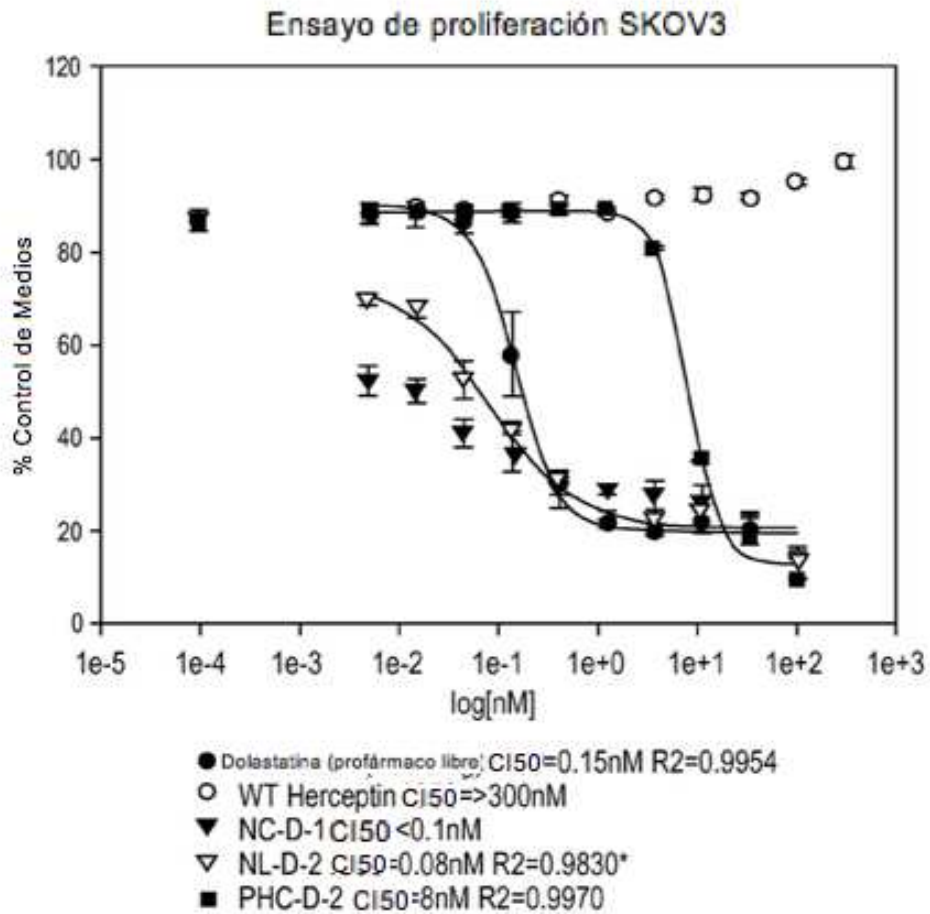


FIG. 6

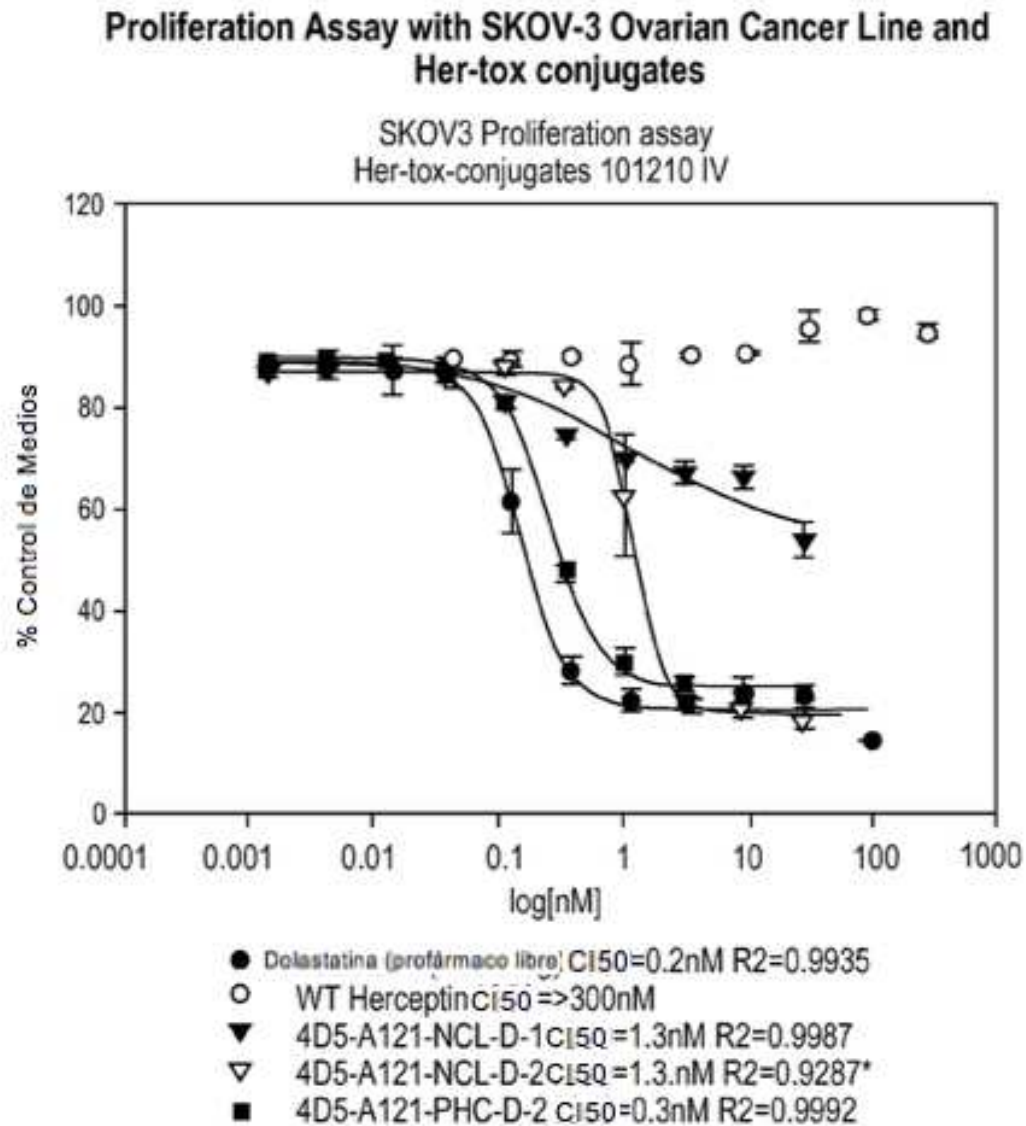


FIG. 7

Ensayo de proliferación con línea de cancer de mama MDA-MB-468 y derivados enlazadores de dolastatina

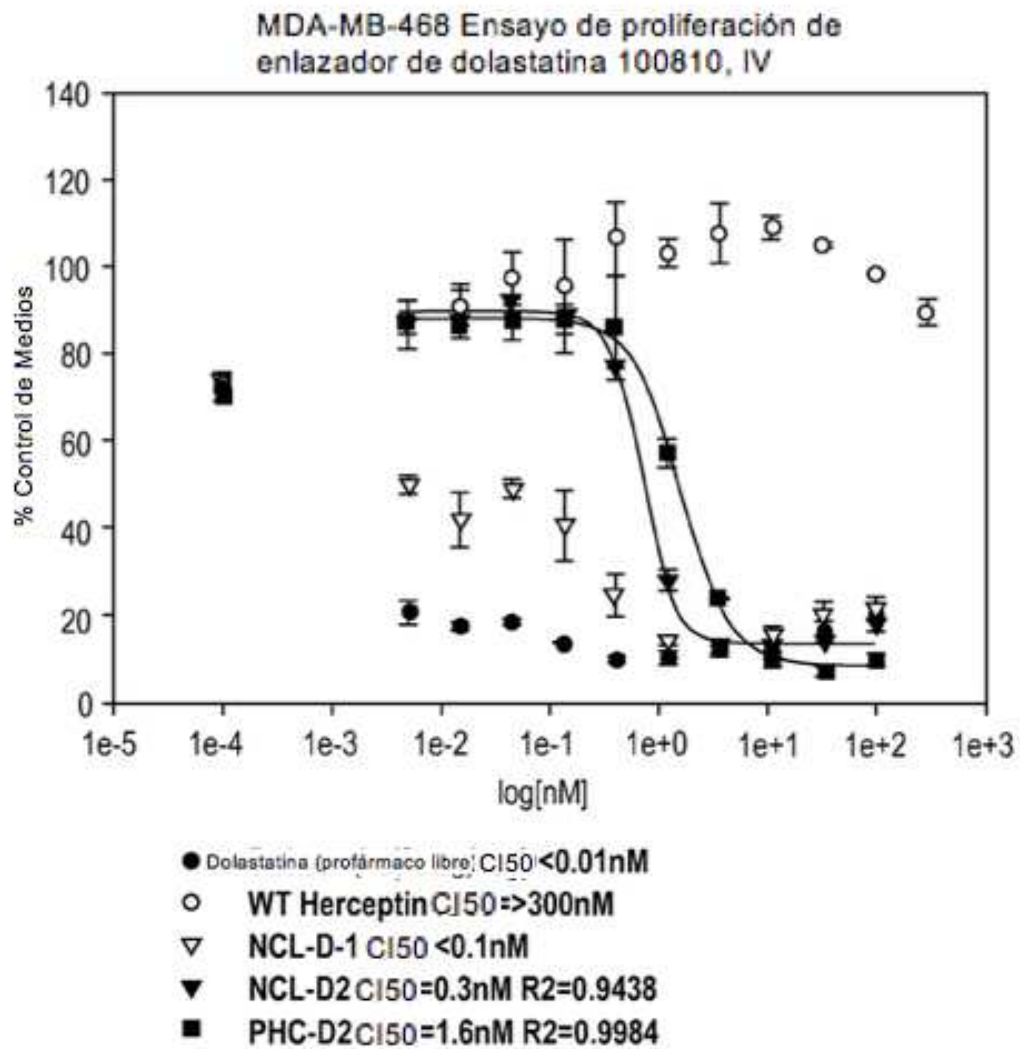


FIG. 8

Ensayo de proliferación con línea de cancer de mama MDA-MB-468 y conjugados de Her-tox

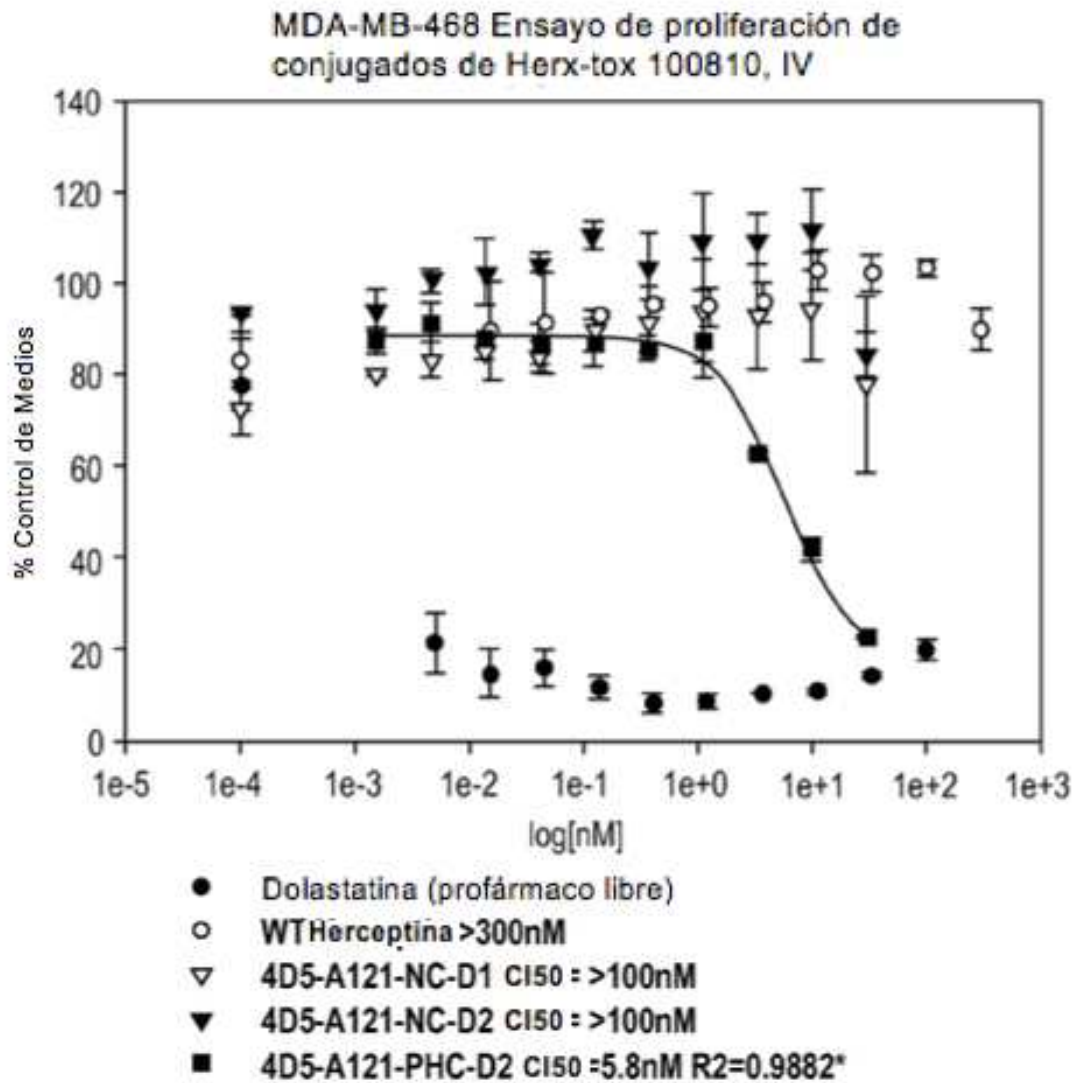


FIG. 9

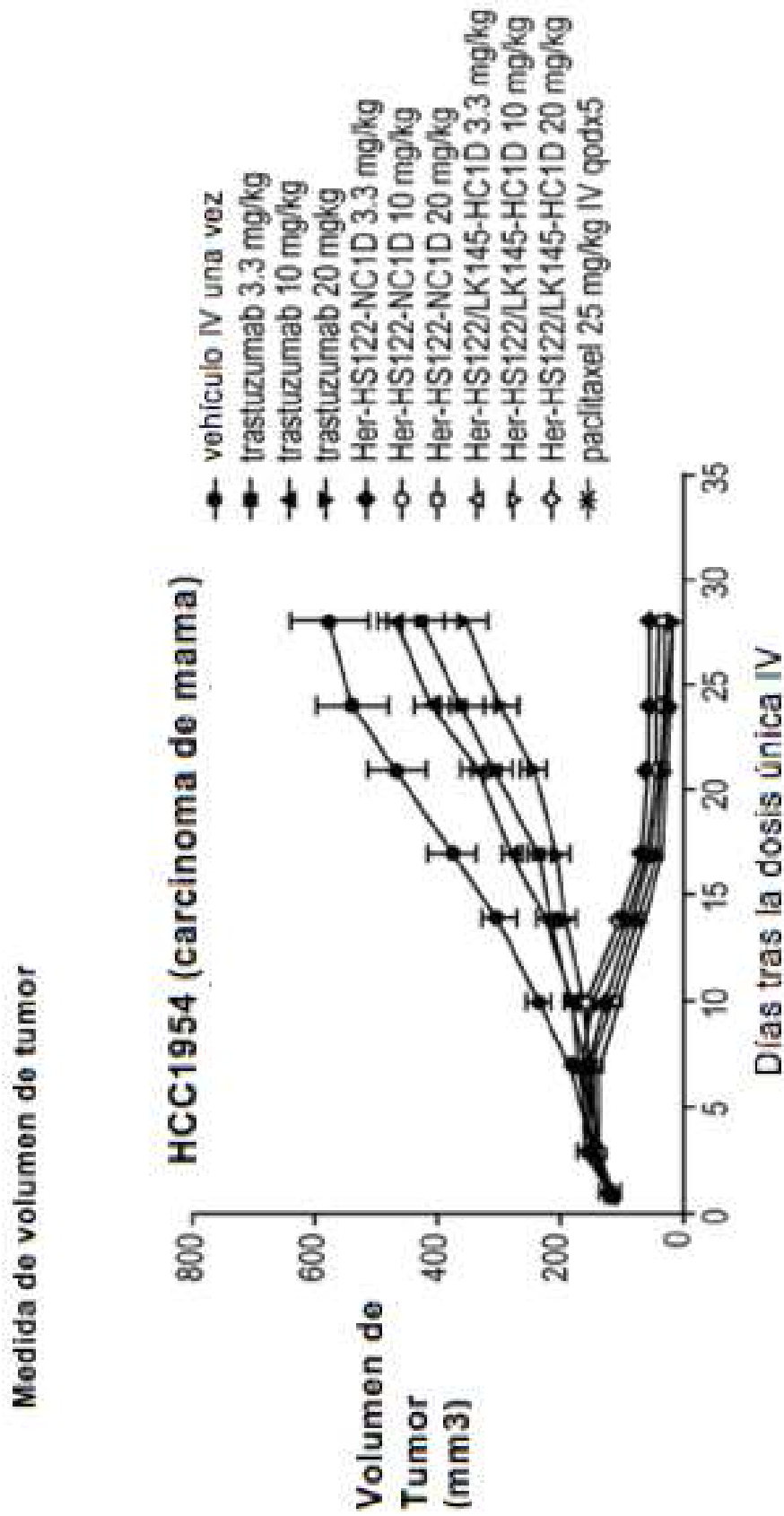


FIG. 10

Formatos de Ensayo Usados para Medir Concentración de Derivativo Enlazada de Dolastatina a HER2 en Suero de Rata SD

Molécula Pequeña(SM)- Dolastatina

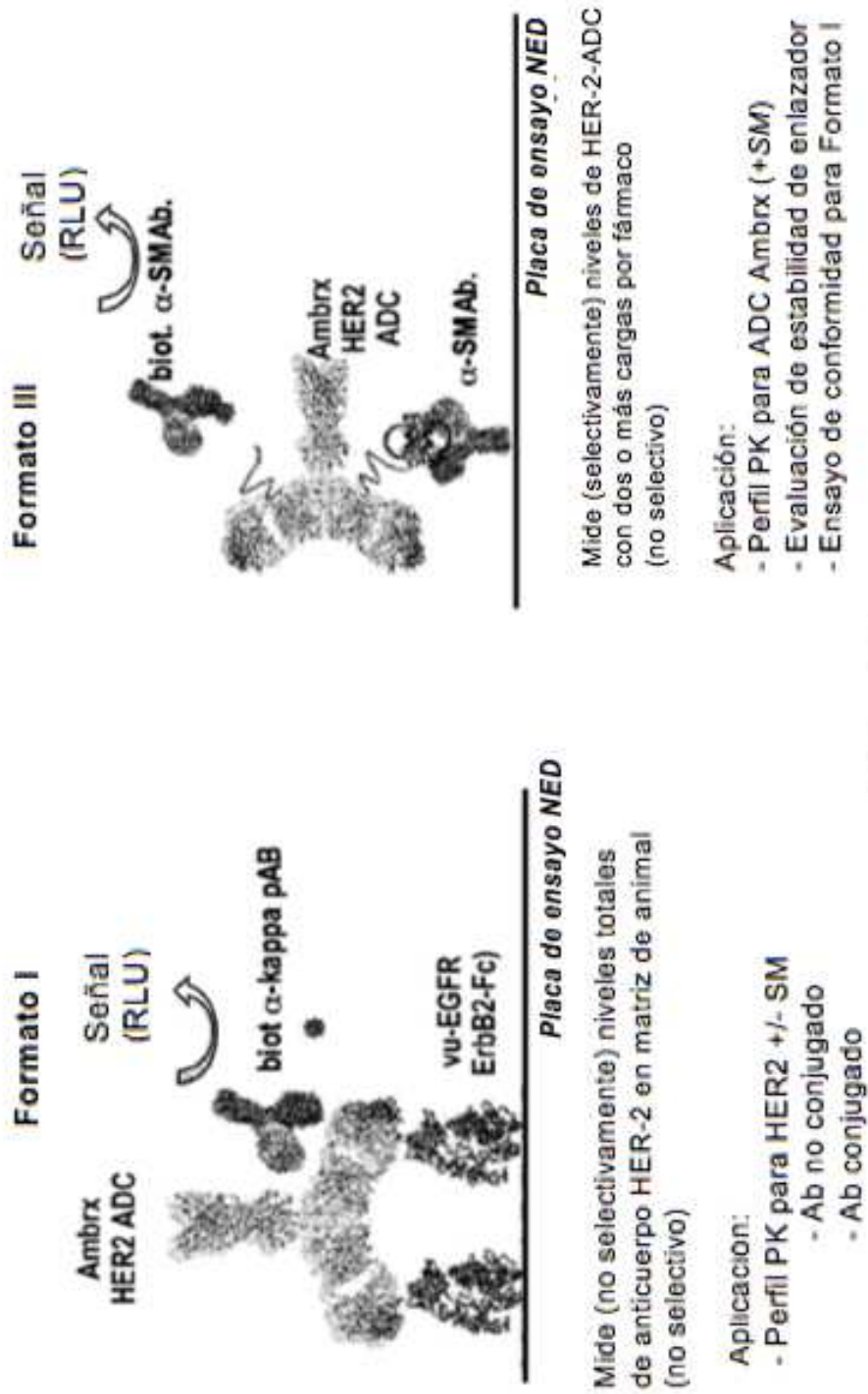


FIG. 11

Resultados PK de rata: Concentraciones de suero de derivados de dolastatina vinculados a Transtuzumab

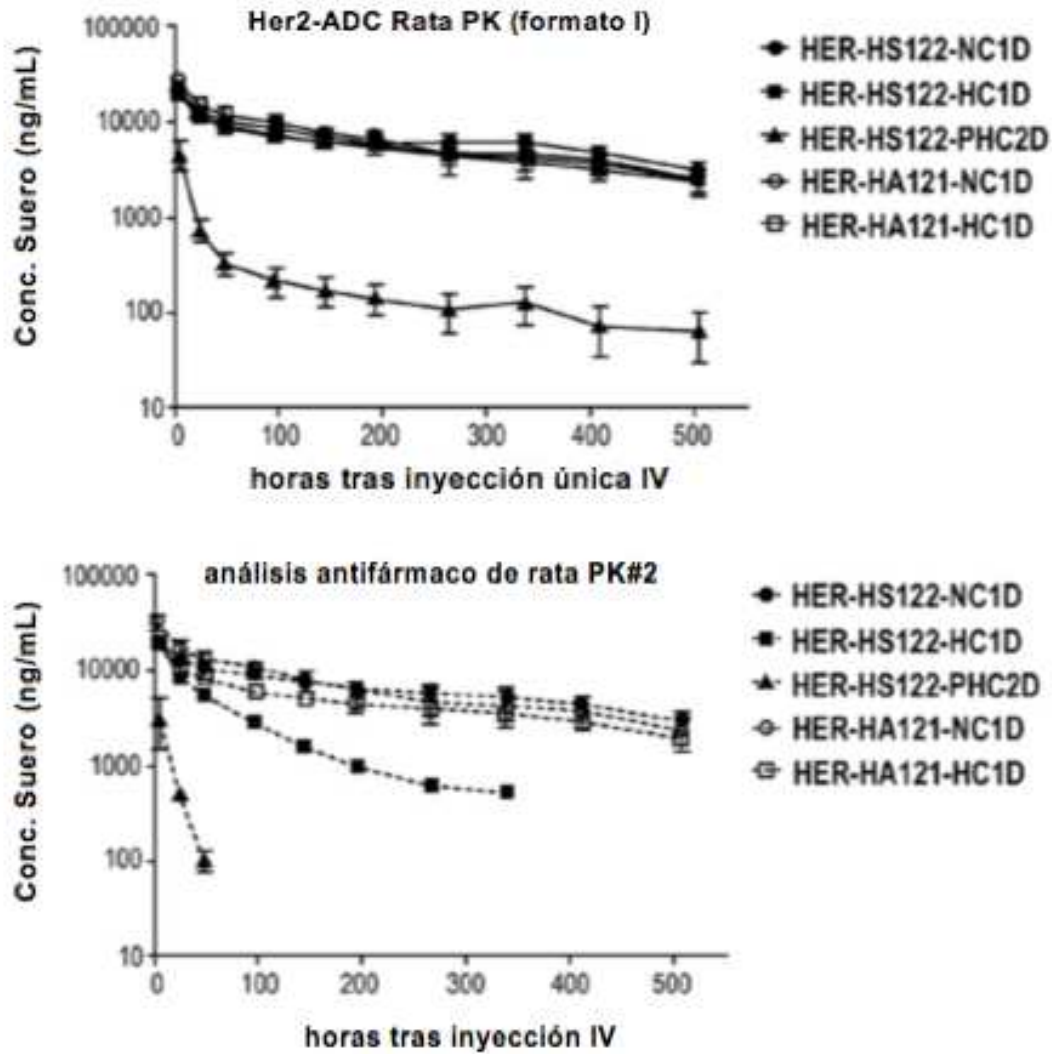


FIG. 12

Datos de rata PK con derivados de dolastatina vinculados a Trastuzumab

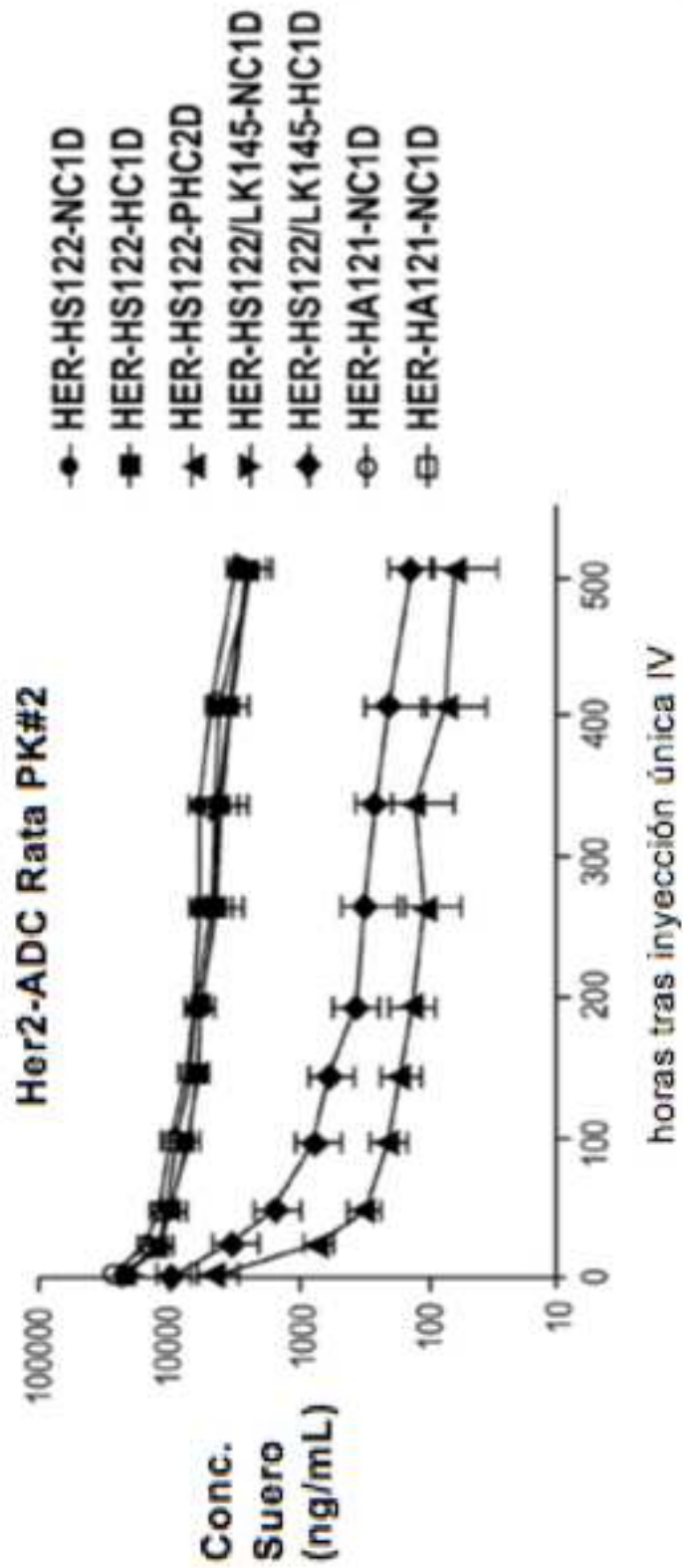


FIG. 13

Mediciones de estabilidad in vivo detectando al menos dos derivados de dolastatina vinculados a trastuzumab

análisis de antifármaco de rata PK#2

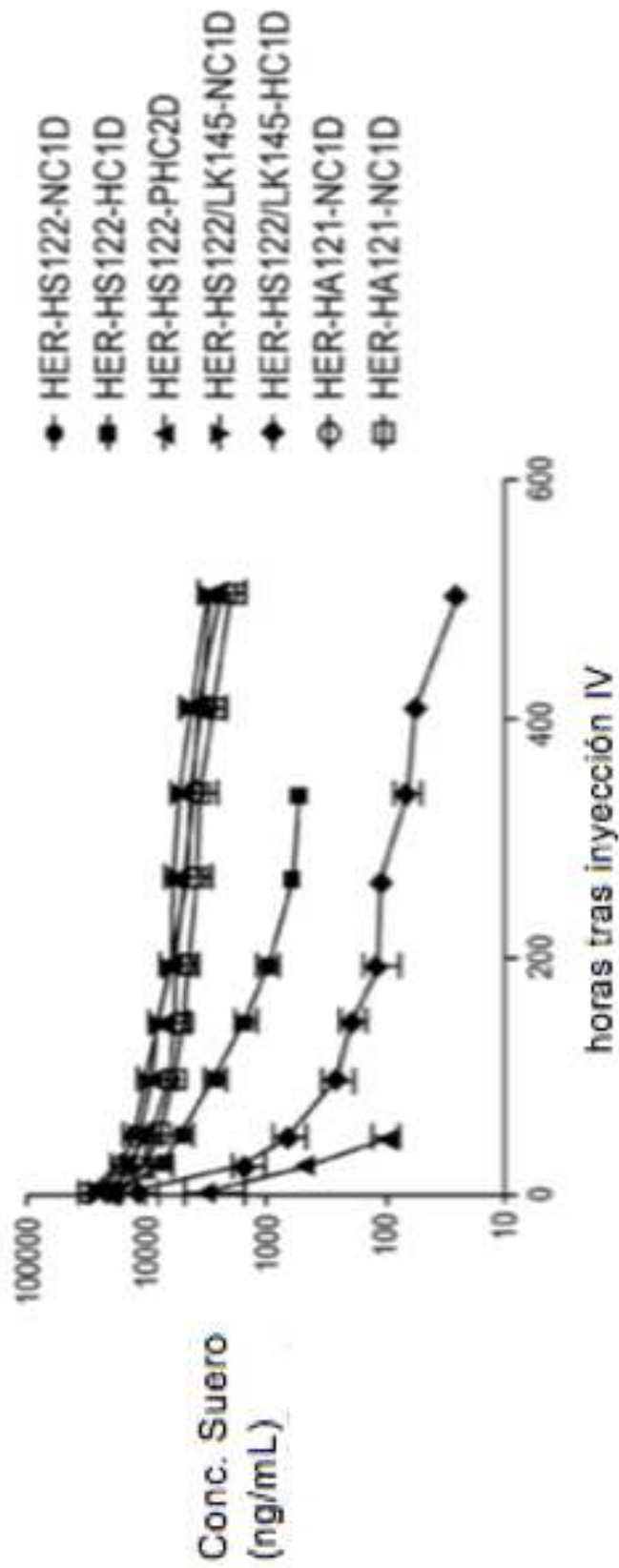


FIG. 14

Datos de rata PK con derivados de dolastatina vinculados a Trastuzumab

HCC1954-e202 Datos de resumen de media grupal (TV = 1000 mm³ o día 60)

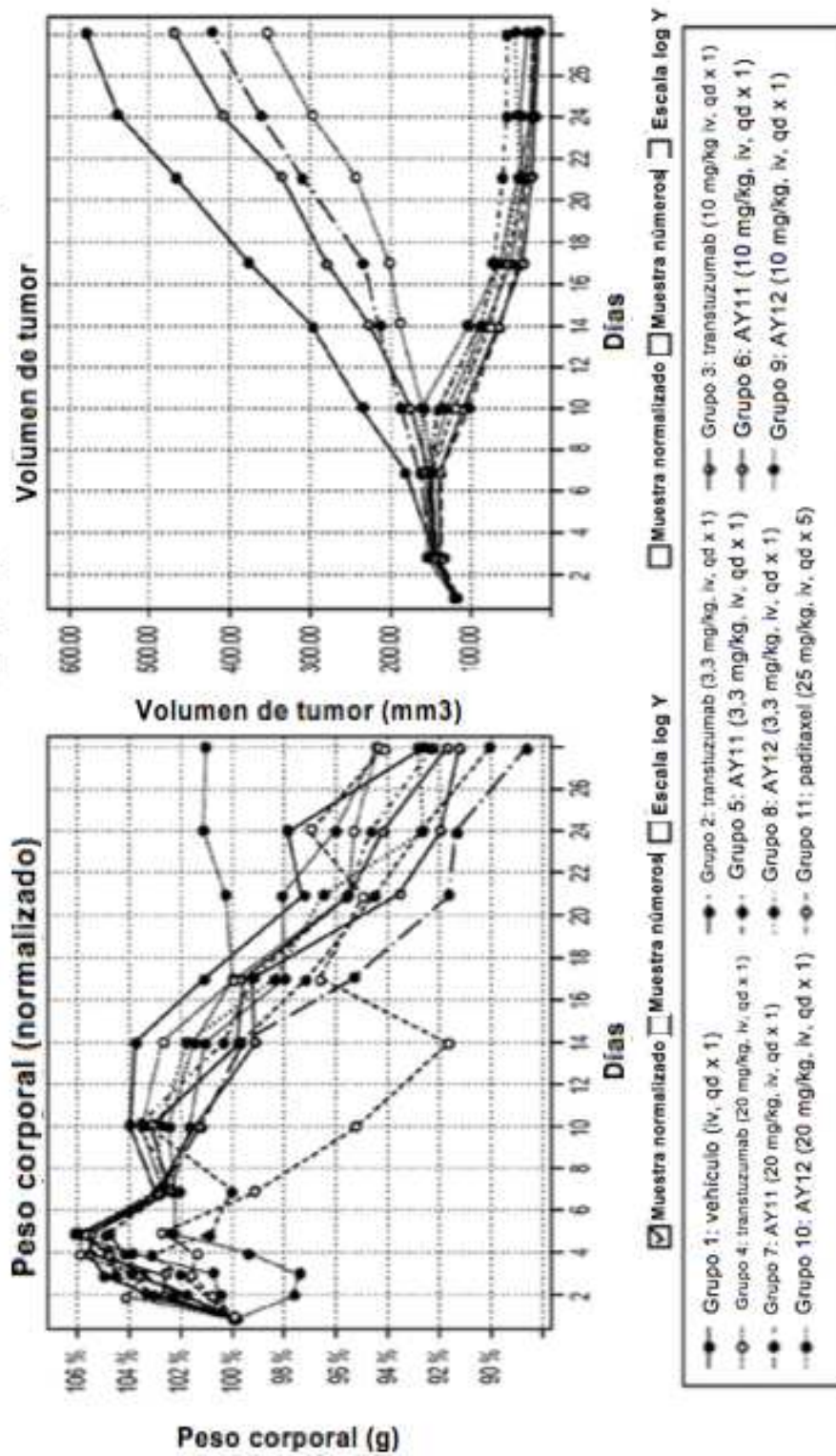


FIG. 15

Eficacia anti-tumor de derivados vinculados a Trastuzumab

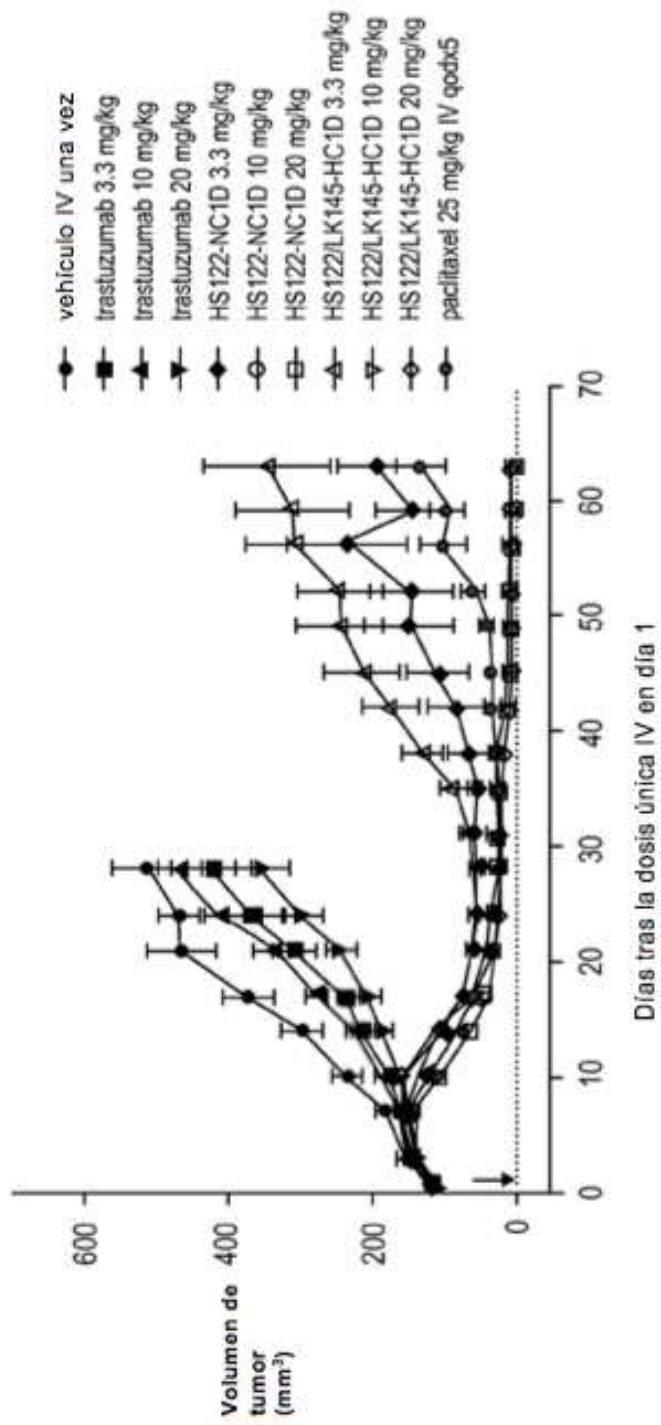


FIG. 16

Eficacia anti-tumor de derivados de enlazadores de dolastatina

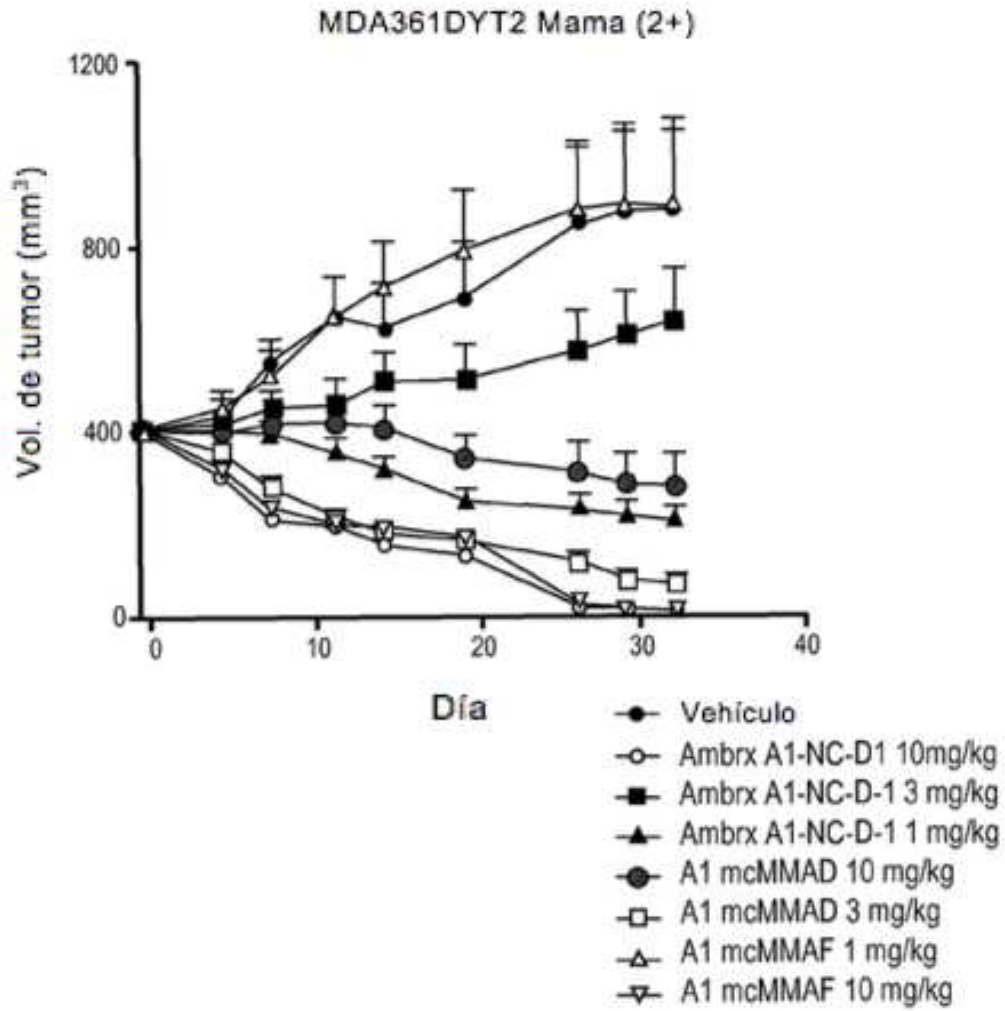


FIG. 17

Eficacidad anti-tumor de derivados de enlazadores de dolastatina

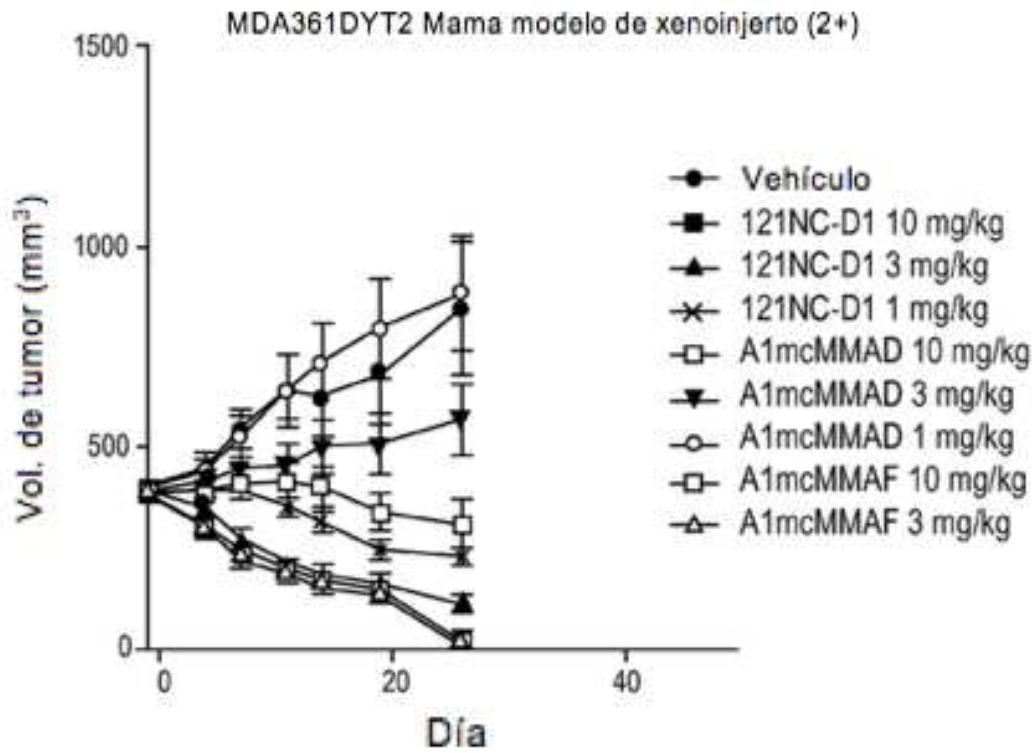


FIG. 18