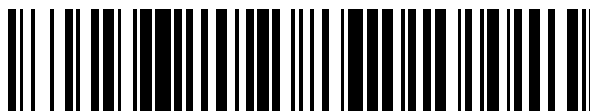


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 039**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2014 PCT/US2014/046141**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15006555**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2014 E 14747214 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 3019522**

54 Título: **Anticuerpos que comprenden múltiples residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos, métodos para su preparación y métodos de uso**

30 Prioridad:

10.07.2013 US 201361844771 P

11.10.2013 US 201361890121 P

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

08.03.2018

73 Titular/es:

SUTRO BIOPHARMA, INC. (100.0%)

310 Utah Street, Suite 150

South San Francisco, California 94080, US

72 Inventor/es:

THANOS, CHRISTOPHER D.;

BALIGA, RAMESH;

PENTA, KALYANI;

GILL, AVINASH;

YIN, GANG y

ZIMMERMAN, ERIK

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 658 039 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que comprenden múltiples residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos, métodos para su preparación y métodos de uso

5

Campo de la invención

En la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden múltiples residuos de aminoácidos no naturales en posiciones sitio-específicas, composiciones que comprenden los anticuerpos, métodos para su producción y métodos de uso.

10

Antecedentes

Los anticuerpos son moléculas biológicas con afinidades notables por sus antígenos objetivo. La naturaleza proporciona anticuerpos como parte de un sistema de defensa en ciertos vertebrados para la eliminación o destrucción de proteínas, células y organismos extraños. Si en un cierto vertebrado se presenta una proteína extraña en, por ejemplo, una célula infectada o una bacteria infecciosa, un anticuerpo puede enlazar su proteína extraña objetivo para dirigir la entidad extraña a su eliminación o destrucción.

15

La afinidad selectiva de los anticuerpos puede ser usada por el hombre para dirigirse a casi cualquier antígeno deseado. El antígeno puede ser una proteína en una célula infectada o un microorganismo infeccioso. Puede ser también, por ejemplo, una proteína en una célula cancerosa, una proteína en una célula de un tejido objetivo, una proteína en el torrente sanguíneo, una proteína en una célula inflamada o inflamatoria o cualquier otra proteína cuya unión selectiva es útil. Por lo tanto, los anticuerpos han encontrado uso en la terapia contra afecciones tales como el cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y rechazo a trasplantes. El anticuerpo puede indicar al sistema inmunitario que destruya o elimine una célula enferma, o un anticuerpo modificado puede transportar una carga molecular útil para destruir el objetivo. En ciertas aplicaciones, los anticuerpos terapéuticos están unidos a protectores moleculares para aumentar su tiempo de vida dentro de un organismo. Los anticuerpos también han encontrado uso como diagnóstico. Estos anticuerpos pueden portar un marcador para indicar la presencia de un antígeno objetivo en una célula o en un tejido. Típicamente, estos marcadores están unidos a los anticuerpos por enlaces covalentes.

20

25

30

Hasta la fecha, las técnicas para enlazar entidades moleculares de anticuerpos tales como cargas moleculares útiles, protectores moleculares y marcadores se han visto limitadas por su heterogeneidad en el grado y la ubicación de la unión a los anticuerpos, por sus bajos rendimientos y por las pérdidas de actividad. Los sitios de conjugación típicos incluyen ubicaciones aleatorias en las cadenas del anticuerpo, por ejemplo, aminas aleatorias en las cadenas laterales de aminoácidos, y el terminal N de ciertas cadenas de anticuerpos. En tales técnicas, algunos anticuerpos pueden estar unidos al conjugado en una ubicación, mientras que algunos anticuerpos están unidos al mismo conjugado en otra ubicación, y algunos anticuerpos pueden no estar unidos en absoluto.

35

El documento US 2005/260711 A1 describe métodos, sistemas y reactivos para regular la interacción de proteínas sensibles al pH incorporando aminoácidos no naturales en la proteína (por ejemplo, un anticuerpo, o su fragmento funcional, derivado, etc.). El documento WO 2006/009901 A2 se refiere a polipéptidos de unión a antígenos que comprenden al menos un aminoácido no codificado de forma natural.

40

45

Existe la necesidad de anticuerpos modificados en posiciones sitio-específicas optimizadas para uniformidad, rendimiento y/o actividad para promover el uso prometedor de anticuerpos, por ejemplo, en la terapia y el diagnóstico.

Breve descripción de la invención

En la presente descripción se proporcionan anticuerpos modificados en dos o más posiciones sitio-específicas con residuos de aminoácidos no naturales. Estas posiciones sitio-específicas son óptimas para la sustitución de un residuo de aminoácido natural con un residuo de aminoácido no natural. En ciertos ejemplos, la sustitución en estas posiciones sitio-específicas produce anticuerpos que son uniformes en sustitución, es decir que se modifican sustancialmente en la posición seleccionada. En ciertos ejemplos, un anticuerpo sustituido en estas posiciones sitio-específicas tiene un rendimiento de producción ventajoso, solubilidad ventajosa, unión ventajosa y/o actividad ventajosa. Las propiedades de estos anticuerpos se describen en detalle en las secciones más abajo.

50

55

En un aspecto, en la presente descripción se proporcionan los anticuerpos reivindicados en la reivindicación 1. El anticuerpo puede ser cualquier polipéptido o polipéptido multimérico reconocido como un anticuerpo por los expertos en la técnica. La cadena de polipéptido puede ser cualquier cadena de polipéptido de anticuerpos, incluyendo cualquier cadena pesada y cualquier cadena ligera. Cada posición en la cadena de polipéptido que es óptimamente sustituible es cualquier posición en la cadena de polipéptido que puede proporcionar una sustitución con rendimiento, uniformidad, solubilidad, unión y/o actividad óptimos. Las secciones más abajo describen en detalle las posiciones óptimamente sustituibles de tales cadenas de polipéptido. También se describen a continuación anticuerpos útiles que comprenden aminoácidos no naturales.

60

65

En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan conjugados de anticuerpos reivindicados en la reivindicación 12.

5 En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones que comprenden dichos anticuerpos reivindicados en la reivindicación 17. Ventajosamente, tales composiciones pueden tener una alta uniformidad debido a la uniformidad de la sustitución de los anticuerpos proporcionados en la presente descripción. En ciertos ejemplos, las composiciones comprenden una cantidad sustancial del anticuerpo cuando se mide por el peso total de la proteína o cuando se mide por el peso total del anticuerpo. En ciertos ejemplos, las composiciones comprenden al menos 80 % del anticuerpo, al menos 85 % del anticuerpo, al menos 90 % del anticuerpo o al menos 95 % del anticuerpo en peso.

10 Además, en la presente descripción se proporcionan métodos para preparar los anticuerpos. Los anticuerpos pueden prepararse mediante cualquier técnica evidente para los expertos en la técnica para incorporar aminoácidos no naturales en las posiciones sitio-específicas de las cadenas de anticuerpos. En ciertos ejemplos, los anticuerpos se preparan por síntesis en fase sólida, semi-síntesis, traducción *in vivo*, traducción *in vitro* o traducción sin células.

15 En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan conjugados de anticuerpos para su uso en terapia, como los reivindicados en la reivindicación 18.

20 Además, en la presente descripción se proporcionan métodos para usar los anticuerpos en terapia. Los anticuerpos dirigidos a un objetivo terapéutico pueden incorporar uno o más aminoácidos no naturales sitio-específicos de acuerdo con la descripción en la presente invención. Estos anticuerpos pueden usarse para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con el objetivo terapéutico. Ventajosamente, un aminoácido no natural sitio-específico pueden usarse para enlazar el anticuerpo a una carga terapéutica para facilitar la eficacia. Los anticuerpos ilustrativos, objetivos terapéuticos y enfermedades o afecciones se describen en la presente descripción.

25 Además, en la presente descripción se proporcionan métodos para usar los anticuerpos para la detección. Los anticuerpos dirigidos al objetivo de detección pueden incorporar uno o más aminoácidos no naturales sitio-específicos de acuerdo con la descripción en la presente. Estos anticuerpos pueden usarse con un marcador para señalar la unión al objetivo de detección. Ventajosamente, un aminoácido no natural sitio-específico puede usarse para enlazar el anticuerpo a un marcador para facilitar la detección. Los anticuerpos, los objetivos de detección y los marcadores ilustrativos se describen en la presente descripción.

30 Además, en la presente descripción se proporcionan métodos para modificar la estabilidad de los anticuerpos. Los anticuerpos pueden modificarse con un aminoácido no natural como se describe en la presente descripción para facilitar la unión a una entidad molecular que puede modificar la estabilidad del anticuerpo. Por ejemplo, un aminoácido no natural sitio-específico puede facilitar la unión a un protector molecular, por ejemplo polietilenglicol, para aumentar la estabilidad de un anticuerpo. Los aminoácidos no naturales ilustrativos y las fracciones de unión se describen en la presente.

40 Breve descripción de las figuras

La Figura 1A proporciona muestras sin tratamiento de ebullición, ni reducción de una reacción de síntesis de proteínas libre de células, que muestran IgG que incorpora múltiples aminoácidos no naturales

45 La Figura 1B proporciona muestras tratadas por ebullición, reducidas, de la reacción de síntesis de proteínas libre de células de La Figura 1A;

50 La Figura 2 proporciona una estrategia de PCR para preparar cadenas pesadas de IgG con dos aminoácidos no naturales cada una;

La Figura 3 proporciona mutantes TAG dobles expresados en presencia de 1 mM pN₃F; La Figura 3A proporciona un autorradiograma de un gel SDS-PAGE, y la Figura 3B proporciona el rendimiento calculado de IgG de longitud completa;

55 La Figura 4 proporciona mutantes TAG dobles expresados en presencia de 1mM pCH₂N₃F; La Figura 4A proporciona un autorradiograma de un gel SDS-PAGE, y la Figura 4B proporciona el rendimiento calculado de IgG de longitud completa;

60 La Figura 5 proporciona curvas de viabilidad celular de SKBR3 en presencia de conjugados anticuerpo-fármaco;

La Figura 6 proporciona un gel SDS-PAGE proporciona un gel de SDS-PAGE con IgG ensambladas que tienen aminoácidos no naturales en sus cadenas pesadas y cadenas ligeras;

65 La Figura 7 proporciona un proceso ilustrativo para conjugar una cadena ligera a un primer fármaco y una cadena pesada a un segundo fármaco;

La Figura 8A proporciona el análisis de espectrometría de masas de un conjugado anticuerpo con dos fármacos; la Figura 8B proporciona el análisis de espectrometría de masas de un segundo conjugado de anticuerpo con dos fármacos;

5

Las Figuras 9A-9H proporcionan espectros de masa de cromatografía líquida usados para determinar las relaciones fármaco a anticuerpo;

10

La Figura 10 proporciona los resultados del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para determinar la relación fármaco a anticuerpo;

15

La Figura 11 proporciona gráficos del volumen tumoral frente al tiempo para dosis de conjugados de anticuerpo-fármaco aglicosilado con cuatro aminoácidos no naturales sitio-específicos como sitios de conjugación y controles de fármaco libre, vehículo y anticuerpo parental;

20

La Figura 12 proporciona una concentración plasmática en el tiempo para un conjugado de anticuerpo-fármaco con cuatro aminoácidos no naturales sitio-específicos como sitios de conjugación;

La Figura 13 proporciona un ajuste del modelo farmacocinético de dos compartimentos de la concentración plasmática en el tiempo para un conjugado de anticuerpo-fármaco con cuatro aminoácidos no naturales sitio-específicos como sitios de conjugación; y

25

La Figura 14 proporciona estabilidad *in vivo* en el tiempo para un conjugado anticuerpo-fármaco con cuatro aminoácidos no naturales sitio-específicos como sitios de conjugación;

La Figura 15 proporciona un autorradiograma de un anticuerpo que incorpora para-azido metil fenilalanina (pAMF) en la posición S7 de la cadena ligera y un aminoácido no natural que contiene tetrazina (nnAA2T) en la posición F404 de la cadena pesada;

30

La Figura 16 proporciona una visión general esquemática de un proceso de producción de anticuerpos que comprenden dos nnAA, seguido por la conjugación con dos fármacos ("carga útil").

Descripción de modalidades ilustrativas

35

En la presente descripción se proporcionan anticuerpos que tienen aminoácidos no naturales en una o más posiciones sitio-específicas, composiciones que comprenden los anticuerpos, métodos para preparar los anticuerpos, y métodos de uso.

Definiciones

40

Cuando se hace referencia a los anticuerpos proporcionados en la presente descripción, los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se indique de cualquier otra forma. A menos que se defina de cualquier otra forma, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por un experto en la técnica. En el caso de que exista una pluralidad de definiciones para un término en la presente, aquellos que se encuentran en esta sección prevalecen a menos que se declare de cualquier otra manera.

45

Como se usa en la presente, las formas singulares "un", "uno/una", y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a un "anticuerpo" es una referencia a uno o más de tales anticuerpos, etc.

50

El término "sustancialmente puro" con respecto a una composición que comprende un anticuerpo se refiere a una composición que incluye al menos 80, 85, 90 o 95 % en peso o, en ciertas modalidades, 95, 98, 99 o 100 % en peso, por ejemplo peso seco, del anticuerpo en relación con la porción restante de la composición. El porcentaje en peso puede ser en relación con el peso total de la proteína en la composición o en relación con el peso total de anticuerpos en la composición. La pureza puede determinarse por técnicas evidentes para los expertos en la técnica, por ejemplo SDS-PAGE.

55

El término "aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con el anticuerpo como se encuentra en su entorno natural o en su entorno de producción, o ambos. Las preparaciones de anticuerpos aislados tienen menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2% o menos de aproximadamente 1% de proteína contaminante en peso, por ejemplo peso seco.

60

65

El término "anticuerpo" se refiere a cualquier macromolécula que sería reconocida como un anticuerpo por los expertos en la técnica. Los anticuerpos comparten propiedades comunes que incluyen la unión a un antígeno y una estructura que comprende al menos una cadena de polipéptido que es sustancialmente idéntica a una cadena de polipéptido que puede ser codificado por cualquiera de los genes de inmunoglobulina reconocidos por los expertos en la técnica. Los genes de inmunoglobulina incluyen, pero no se limitan a, los genes de región constante κ , λ , α , γ (IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4), δ , ϵ y μ , así como los genes de región variable de inmunoglobulina (por ejemplo, los genes IGHV, IGHD, IGHJ, IGLV, IGKV, IGLJ, e IGKJ). El término incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo reconocidos por los expertos en la técnica, y variantes de estos.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a cualquier forma de un anticuerpo que no sea la forma de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpo en la presente descripción incluyen anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de anticuerpos de longitud completa, y anticuerpos que han sido modificados. Los fragmentos de anticuerpo incluyen pero no se limitan a Fv, Fc, Fab, y (Fab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de dominio (dAbs), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones marco, regiones constantes, y similares (Maynard y Georgiou, 2000, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2:339-76; Hudson, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:395-402).

El término "inmunoglobulina (Ig)" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por uno o más de los genes de inmunoglobulina, o una proteína sustancialmente idéntica en la secuencia de aminoácidos. Las inmunoglobulinas incluyen, pero sin limitarse a, los anticuerpos. Las inmunoglobulinas pueden tener un número de formas estructurales, que incluyen pero no se limitan a anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, y dominios de inmunoglobulina individuales que incluyen pero no se limitan a V_H, D_H, J_H, C_H (por ejemplo, C γ 1, C γ 2, C γ 3), V_L, J_L, y C_L (por ejemplo, V κ y V λ).

El término "dominio de inmunoglobulina (Ig)" se refiere a un dominio de proteína que consiste en un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina. Los dominios de Ig incluyen pero no se limitan a V_H, D_H, J_H, C_H (por ejemplo, C γ 1, C γ 2, C γ 3), V_L, J_L, y C_L (por ejemplo, V κ y V λ).

El término "región variable" de un anticuerpo se refiere a un polipéptido o polipéptidos compuestos por el dominio de inmunoglobulina V_H, los dominios de inmunoglobulina V_L, o los dominios de inmunoglobulina V_H y V_L. La región variable puede referirse a este o a estos polipéptidos aisladamente, o como un fragmento (por ejemplo, como un fragmento Fv o como un fragmento scFv), como esta región en el contexto de un fragmento de anticuerpo más grande, o como esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o una molécula no anticuerpo, andamio alternativa.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre anticuerpos y son responsables de la especificidad de unión de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de anticuerpos. Esta se concentra en tres segmentos llamados Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR). Tres de las CDR se localizan en el dominio variable de cadena ligera y tres de las CDR se localizan en el dominio variable de cadena pesada. Las regiones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una configuración de lámina β , conectadas por tres CDR, que forman lazos que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen unidas a corta distancia por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión de los anticuerpos al antígeno (ver Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Los dominios constantes típicamente no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras. En dependencia de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. De las varias clases de inmunoglobulina humana, se sabe que sólo las IgG1, IgG2, IgG3 e IgM humanas activan el complemento.

El término "secuencia de proteína variante" se refiere a una secuencia de proteína que tiene uno o más residuos que difieren en la identidad de aminoácidos de otra secuencia de proteína similar. Dicha secuencia de proteína similar puede ser la secuencia de proteína de tipo silvestre natural, u otra variante de la secuencia silvestre. Las variantes incluyen proteínas que tienen una o más inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. Las variantes incluyen además proteínas que tienen uno o más aminoácidos modificados postraduccionalmente.

El término "anticuerpo parental" se refiere a cualquier anticuerpo conocido por los expertos en la técnica que se modifica de acuerdo con la descripción proporcionada en la presente. La modificación puede ser física, es decir, reemplazar o modificar químicamente o bioquímicamente uno o más aminoácidos del anticuerpo parental para producir un anticuerpo

dentro del alcance de la presente descripción. La modificación también puede ser conceptual, es decir, usando la secuencia de una o más cadenas de polipéptidos del anticuerpo parental para diseñar un anticuerpo que comprende uno o más aminoácidos no naturales sitio-específicos de acuerdo con la presente descripción. Los anticuerpos parentales pueden ser anticuerpos de origen natural o anticuerpos diseñados o desarrollados en un laboratorio. Los anticuerpos parentales también pueden ser anticuerpos artificiales o modificados, por ejemplo, anticuerpos quiméricos o humanizados.

El término "variante modificada conservadoramente" se refiere a un anticuerpo que difiere de un anticuerpo relacionado por sustituciones conservadoras en la secuencia de aminoácidos. Un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a un péptido, polipéptido o secuencia proteica que altera, agrega o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante conservadoramente modificada" donde la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen en la técnica. Tales variantes conservadoramente modificadas son otras además de las variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos, y no excluyen estas, como se describe en la presente descripción.

Los siguientes ocho grupos 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), Histidina (H);
- 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)

(ver, por ejemplo, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2da edición (diciembre de 1993))

Los términos "idéntico" o "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" si estas tienen un porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, aproximadamente 60% de identidad, opcionalmente aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, aproximadamente 99.5%, o aproximadamente 99.9% de identidad sobre una región especificada), cuando se compara y alinea para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante alineación manual e inspección visual. La identidad puede existir en una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 50 residuos de aminoácidos o nucleótidos, en una región que tiene una longitud de aproximadamente 10-17 residuos (por ejemplo, la longitud aproximada de CDRL1), en una región que tiene una longitud de aproximadamente 7 residuos (por ejemplo, la longitud aproximada de CDRL2), en una región que tiene una longitud de aproximadamente 7-11 residuos (por ejemplo, la longitud aproximada de CDRL3), en una región que tiene una longitud de aproximadamente 10-12 residuos (por ejemplo, la longitud aproximada de CDRH1), en una región que tiene una longitud de aproximadamente 16-19 residuos (por ejemplo, la longitud aproximada de CDRH2), en una región que tiene una longitud de aproximadamente 3-35 residuos (por ejemplo, la longitud aproximada de CDRH3), o en una región que tiene una longitud de 75-100 residuos de aminoácidos o nucleótidos, o, donde no se especifica, a través de toda la secuencia o un polipéptido. En el caso de los anticuerpos, la identidad puede medirse fuera de las CDR variables. La identidad también se puede medir dentro de la totalidad de las cadenas pesadas o ligeras, o dentro de las regiones variables de las cadenas pesadas o ligeras. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede realizarse por, incluyendo pero sin limitarse a, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, por el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, por la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de programas Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.); o por alineamiento manual e inspección visual (ver, por ejemplo, Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 suplemento)).

Ejemplos de algoritmos que son apropiados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y otros (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, y Altschul y otros (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El software para realizar el análisis de BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional de Información de Biotecnología. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para las secuencias nucleotídicas) usa como defecto una longitud de palabra (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 usa como defecto una longitud de palabra de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una

comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST normalmente se realiza con el filtro de "baja complejidad" desactivado.

5 El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin
Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo
BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad con que
dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos coincidan al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar
a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación entre el ácido nucleico
10 del ensayo y el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0.2, con mayor preferencia menor que
aproximadamente 0.01 y con la máxima preferencia menor que aproximadamente 0.001.

15 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y no natural, así como a iminoácidos tales como
prolina, análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de
origen natural.

Los aminoácidos codificados naturalmente son los aminoácidos proteínogénicos conocidos por los expertos en la
técnica. Estos incluyen los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina,
ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano,
20 tirosina, y valina) y los menos comunes pirrolisina y selenocisteína. Los aminoácidos codificados naturalmente incluyen
variantes postraduccionales de los 22 aminoácidos de origen natural tal como aminoácidos prenilados, aminoácidos
isoprenilados, aminoácidos miristoilados, aminoácidos palmitoilados, aminoácidos glicosilados ligados a N, aminoácidos
glicosilados ligados a O, aminoácidos fosforilados y aminoácidos acilados.

25 El término "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que no es un aminoácido proteínogénico, o una variante
postraduccionally modificada de este. En particular, el término se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20
aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína, o variantes postraduccionally modificadas de estos.

30 Una "proteína funcional del Factor de Liberación 1 (RF1)" se refiere a la RF1 que retiene una actividad igual o
sustancialmente similar a la proteína RF1 silvestre o no modificada. La actividad de RF1 funcional se puede probar, por
ejemplo, midiendo la velocidad de crecimiento de bacterias que expresan la proteína RF1 modificada, y comparando la
velocidad de crecimiento con bacterias que expresan RF1 silvestre o no modificada. La actividad de RF1 funcional se
puede probar, además, por ejemplo, por la capacidad de la proteína RF1 modificada para reducir la incorporación de
ARNt ortogonal de un nnAA en una posición específica en un ARNm que codifica una proteína objetivo, y aumentar así
35 la cantidad de terminación prematura de la cadena (es decir, aumentar la cantidad de proteína truncada).

Una "proteína atenuada del Factor de Liberación 1 (RF1)" se refiere a una RF1 modificada que tiene actividad reducida
en relación con la proteína RF1 silvestre o no modificada. La actividad de RF1 puede probarse, por ejemplo, por la
capacidad de la proteína RF1 modificada para reducir la incorporación de ARNt ortogonal de un nnAA en una posición
específica en un ARNm que codifica una proteína objetivo, y aumentar así la cantidad de terminación prematura de la
40 cadena (es decir, aumentar la cantidad de proteína truncada). En algunos ejemplos, la proteína RF1 atenuada
comprende modificaciones transcripcionales; por ejemplo, el nivel de expresión de la proteína RF1 (silvestre o
modificada) se puede reducir para lograr la atenuación. La reducción puede lograrse además usando tecnologías de
ARNi. En algunos ejemplos, la proteína RF1 atenuada comprende modificaciones traduccionales; por ejemplo, la
45 cantidad de la proteína RF1 sintetizada (silvestre o modificada) puede reducirse para lograr la atenuación, por ejemplo,
aumentando la velocidad a la que la proteasa digiere la proteína mediante la inserción de una secuencia específica de
proteasa en la secuencia de RF1.

50 El término "alqueno tensionado" se refiere a una molécula que comprende una fracción de alqueno que es capaz de
reaccionar con tetrazina en una ligadura de tetrazina. Las ligaduras de tetrazina ilustrativas se describen en Blackman y
otros, 2008, J. Am. Chem. Soc. 130:13518-13519. Los ejemplos incluyen *trans*-ciclooctenos y norbornenos. Los
compuestos útiles incluyen, pero no se limitan a, *trans*-cicloocteno, (*E*)-ciclooct-4-enol, (*E*)-ciclooct-4-enil 2,5-dioxo-1-
pirrolidinil carbonato, succinimidil éster del ácido 5-norborneno-2-acético, y ácido 5-norborneno-2-endo-acético.

55 Anticuerpos

En la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más residuos de aminoácidos no
naturales en posiciones sitio-específicas en la secuencia de aminoácidos de, colectivamente, una o más cadenas de
polipéptidos. Como se describió anteriormente, los residuos de aminoácidos no naturales están en posiciones
específicas en la secuencia de aminoácidos. Estas posiciones se seleccionan basado en las propiedades ventajosas de
60 los anticuerpos que tienen aminoácidos no naturales en estas posiciones. Las propiedades ventajosas pueden
relacionarse con el rendimiento de producción, la conjugación, la solubilidad, la unión y/o la actividad ventajosa.

65 En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende dos o más aminoácidos no naturales en posiciones sitio-específicas. En
ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende tres o más aminoácidos no naturales en posiciones sitio-específicas. En
ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende cuatro o más aminoácidos no naturales en posiciones sitio-específicas. En

el anticuerpo comprende al menos dos aminoácidos no naturales sitio-específicos en cada uno de los dos polipéptidos de cadena ligera y al menos dos aminoácidos no naturales sitio-específicos en cada uno de los dos polipéptidos de cadena pesada.

5 Los anticuerpos proporcionados en la presente pueden ser de cualquier clase o tipo conocido por los expertos en la técnica. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada de cualquier tipo conocido por los expertos en la técnica. En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena pesada de un tipo seleccionado del grupo que consiste en α , δ , ϵ y μ . En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena pesada α . En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena pesada δ . En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena pesada ϵ . En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena pesada μ .

10 En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera de cualquier tipo conocido por los expertos en la técnica. En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena ligera de un tipo seleccionado del grupo que consiste en λ y κ . En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena ligera λ . En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena ligera κ .

15 Cualquiera de los anticuerpos anteriores puede ser de cualquier clase conocida para los expertos en la técnica. En ciertos ejemplos, el anticuerpo es de una clase o subclase seleccionada del grupo que consiste en IgA, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgM. En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo IgA. En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo IgA1 o un IgA2. En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo IgD. En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo IgE. En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG3. En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo IgM.

20 El anticuerpo puede ser cualquier forma de anticuerpo conocido por los expertos en la técnica. En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo reconocido por los expertos en la técnica. En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo Fv, Fc, Fab o (Fab')₂. En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv). En ciertos ejemplos, el anticuerpo está en forma de Fv, Fc, Fab, (Fab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv) y/o scFv-Fc.

25 El anticuerpo puede compartir una alta identidad de secuencia con cualquier anticuerpo reconocido por los expertos en la técnica, es decir un anticuerpo parental. En ciertos ejemplos, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo es idéntica a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo parental, distinto de los aminoácidos no naturales en la posición sitio-específica. En ejemplos adicionales, el anticuerpo proporcionado en la presente puede tener uno o más inserciones, deleciones o mutaciones en relación con el anticuerpo parental además de uno o más aminoácidos no naturales en las posiciones sitio-específicas. En ciertos ejemplos, el anticuerpo proporcionado en la presente puede tener una secuencia primaria única siempre que sea reconocido como un anticuerpo por los expertos en la técnica.

30 El anticuerpo es típicamente una proteína que comprende múltiples cadenas de polipéptidos. En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un heterotetrámero que comprende dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera puede enlazarse a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente. Cada cadena pesada puede enlazarse a la otra cadena pesada por uno o más enlaces disulfuro covalentes. Cada cadena pesada y cada cadena ligera pueden tener además uno o más enlaces disulfuro entre las cadenas. Como es conocido por los expertos en la técnica, cada cadena pesada típicamente comprende un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera típicamente comprende un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante. Como es conocido por los expertos en la técnica, los anticuerpos típicamente tienen afinidad selectiva por sus moléculas objetivos, es decir los antígenos.

35 Los aminoácidos no naturales se posicionan en localizaciones seleccionadas en una cadena de polipéptido del anticuerpo. Estas ubicaciones se identificaron porque proporcionan sitios óptimos para la sustitución con aminoácidos no naturales. Cada sitio es capaz de portar un aminoácido no natural con estructura, función y/o métodos óptimos para producir el anticuerpo.

40 En ciertos ejemplos, una posición sitio-específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que es estable. La estabilidad puede medirse mediante cualquier técnica evidente para los expertos en la técnica. En ciertos ejemplos, el conjugado o anticuerpo sustituido tiene una temperatura de fusión que está entre aproximadamente 5 °C del anticuerpo parental correspondiente, como se describe en la presente descripción. En ciertos ejemplos, el conjugado o anticuerpo sustituido tiene una temperatura de fusión que está entre aproximadamente 4 °C del anticuerpo parental correspondiente, como se describe en la presente descripción. En ciertos ejemplos, el conjugado o anticuerpo sustituido tiene una temperatura de fusión que está entre aproximadamente 3 °C del anticuerpo parental correspondiente, como se describe en la presente descripción. En ciertos ejemplos, el conjugado o anticuerpo sustituido tiene una temperatura de fusión que está entre aproximadamente 2 °C del anticuerpo parental correspondiente, como se describe en la presente descripción. En ciertos ejemplos, el conjugado o anticuerpo sustituido tiene una temperatura de fusión que está entre aproximadamente 1 °C del anticuerpo parental correspondiente, como se describe en la presente descripción. En ciertos ejemplos, el conjugado o anticuerpo sustituido tiene una temperatura de fusión que es al menos aproximadamente 5 °C mayor que el anticuerpo parental correspondiente, como se describe en la presente descripción. En ciertos ejemplos, el conjugado o anticuerpo sustituido tiene una temperatura de fusión que es al menos aproximadamente 4 °C mayor que el anticuerpo parental correspondiente, como se describe en la presente descripción. En ciertos ejemplos, el conjugado o

- anticuerpo sustituido tiene una temperatura de fusión que es al menos aproximadamente 3 °C mayor que el anticuerpo parental correspondiente, como se describe en la presente descripción. En ciertos ejemplos, el conjugado o anticuerpo sustituido tiene una temperatura de fusión que es al menos aproximadamente 2 °C mayor que el anticuerpo parental correspondiente, como se describe en la presente descripción. En ciertos ejemplos, el conjugado o anticuerpo sustituido
- 5 tiene una temperatura de fusión que es al menos aproximadamente 1 °C mayor que el anticuerpo parental correspondiente, como se describe en la presente descripción. La temperatura de fusión puede ser Tm1, Tm2 o ambas Tm1 y Tm2 como se reconocerá por los expertos en la técnica.
- En ciertos ejemplos, una posición sitio-específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que tiene propiedades funcionales óptimas. Por ejemplo, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida de afinidad de unión para su antígeno objetivo comparado con un anticuerpo sin el aminoácido no natural sitio-específico. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar una unión mejorada comparado con un anticuerpo sin el aminoácido no natural sitio-específico.
- 10 En ciertos ejemplos, una posición sitio-específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que puede producirse ventajosamente. Por ejemplo, en ciertos ejemplos, el anticuerpo muestra propiedades ventajosas en sus métodos de síntesis, discutidos más abajo. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida en el rendimiento en la producción comparado con un anticuerpo sin el aminoácido no natural sitio-específico. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar un mejor rendimiento en la producción comparado con un anticuerpo sin el aminoácido no natural sitio-específico. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida de supresión de ARNt, descrita más abajo, comparado con un anticuerpo sin el aminoácido no natural sitio-específico. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar una supresión mejorada de ARNt, descrita más abajo, en la producción comparado con un anticuerpo sin el aminoácido no natural sitio-específico.
- 15 En ciertos ejemplos, una posición sitio-específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que tiene solubilidad ventajosa. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida en solubilidad comparado con un anticuerpo sin el aminoácido no natural sitio-específico. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar mejor solubilidad comparado con un anticuerpo sin el aminoácido no natural sitio-específico.
- 20 En ciertos ejemplos, una posición sitio-específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que tiene expresión ventajosa. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida en expresión comparado con un anticuerpo sin el aminoácido no natural sitio-específico. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar mejor expresión comparado con un anticuerpo sin el aminoácido no natural sitio-específico.
- 25 En ciertos ejemplos, una posición sitio-específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que tiene un plegado ventajoso. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida en el plegado apropiado comparado con un anticuerpo sin el aminoácido no natural sitio-específico. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar un mejor plegado comparado con un anticuerpo sin el aminoácido no natural sitio-específico.
- 30 En ciertos ejemplos, una posición sitio-específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que es capaz de conjugación ventajosa. Como se describió anteriormente, varios aminoácidos no naturales tienen cadenas laterales o grupos funcionales que facilitan la conjugación del anticuerpo con un segundo agente, ya sea directamente o a través de un enlazador. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar una eficiencia mejorada de la conjugación comparado con un anticuerpo sin el mismo u otros aminoácidos no naturales en otras posiciones. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar un rendimiento mejorado de la conjugación comparado con un anticuerpo sin el mismo u otros aminoácidos no naturales en otras posiciones. En ciertos ejemplos, el anticuerpo puede mostrar especificidad mejorada de la conjugación comparado con un anticuerpo sin el mismo u otros aminoácidos no naturales en otras posiciones.
- 35 En ciertos ejemplos, uno o más aminoácidos no naturales se localizan en posiciones sitio-específicas seleccionadas en al menos una cadena de polipéptido del anticuerpo. La cadena de polipéptido puede ser cualquier cadena de polipéptido del anticuerpo sin limitación, incluyendo la cadena ligera o la cadena pesada. La posición sitio-específica puede estar en cualquier dominio del anticuerpo, incluyendo cualquier dominio variable y cualquier dominio constante.
- 40 En ciertos ejemplos, los anticuerpos proporcionados en la presente comprenden un aminoácido no natural en una posición sitio-específica. En ciertos ejemplos, los anticuerpos proporcionados en la presente comprenden dos aminoácidos no naturales en posiciones sitio-específicas. En ciertos ejemplos, los anticuerpos proporcionados en la presente comprenden tres aminoácidos no naturales en posiciones sitio-específicas. En ciertos ejemplos, los anticuerpos proporcionados en la presente comprenden más de tres aminoácidos no naturales en posiciones sitio-específicas.
- 45 En ciertos ejemplos, los anticuerpos proporcionados en la presente comprenden más de tres aminoácidos no naturales en posiciones sitio-específicas.
- 50 Las posiciones sitio-específicas para la sustitución pueden ser descritas con cualquier sistema de nomenclatura de anticuerpos conocido por los expertos en la técnica. En el sistema de numeración de Kabat, estas posiciones están en los residuos de cadena pesada o cadena ligera L22, L7, H25, H40, H19, H52, H70, y H110. En el sistema de numeración de EU, estas posiciones están en los residuos de cadena pesada o cadena ligera H404, H121, H180, L152, H136, H119, H190, H222, y H221. En otras palabras, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que
- 55
- 60

comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de Kabat L22, L7, H25, H40, H19, H52, H70, y H110; y los residuos de EU H404, H121, H180, L152, H136, H119, H190, H222, y H221.

5 En otros ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de EU H404, H121, H180, H136, H119, H190, H222, y H221; y los residuos de Kabat H25, H40, H19, H52, H70, y H110.

10 En otros ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de Kabat H005, H023, H042, H065, H074, y H084; y los residuos de EU H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H342, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H404, H420, H421, H436, y H438.

20 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de Kabat H005, H023, H074, y H084; y los residuos de EU H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H239, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H342, H344, H355, H359, H375, H386, H389, H392, H398, H404, H420, H421, y H438.

25 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de Kabat H005, H023, y H084; y los residuos de EU H118, H119, H132, H134, H136, H137, H160, H162, H172, H239, H241, H267, H269, H270, H271, H272, H282, H286, H292, H293, H296, H298, H329, H330, H334, H335, H340, H355, H359, H386, H389, H404, H420, H421, H438, y H342.

30 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de Kabat H005 y H084; y los residuos de EU H118, H132, H136, H239, H293, H334, H355, H359, y H389.

35 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de Kabat H023 y H074; y los residuos de EU H119, H134, H135, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H335, H337, H339, H342, H344, H355, H375, H386, H392, H398, H404, H420, H421, H340 y H438.

45 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de Kabat H042 y H065; y los residuos de EU H138, H155, H174, H176, H177, H219, H238, H243, H262, H264, H265, H278, H342, H356, H358, H360, H383, H384 H404, y H436.

50 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de EU correspondientes a H292-H301, H303, y H305.

55 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de Chothia H005, H023, H042, H065, H074, y H084; y los residuos de EU H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H342, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H404, H420, H421, H436, y H438.

60 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de Chothia H005, H023, H074, y H084; y los residuos de EU H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H239, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H342, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H404, H420, H421, H436, y H438.

H333, H334, H335, H337, H339, H340, H342, H344, H355, H359, H375, H386, H389, H392, H398, H404, H420, H421, y H438.

5 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de Chothia H005 y H084; y los residuos de EU H118, H132, H136, H239, H293, H334, H342, H355, H359, H389 y H404.

10 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de EU correspondientes a H292-H301, H303, y H305.

15 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de Chothia H023 y H074; y los residuos de EU H119, H134, H135, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H335, H337, H339, H342, H344, H355, H375, H386, H392, H398, H420, H421, H340, H404, y H438.

20 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos de Chothia H042 y H065; y los residuos de EU H138, H155, H174, H176, H177, H219, H238, H243, H262, H264, H265, H278, H342, H356, H358, H360, H383, H384, H404, y H436.

25 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de residuos de Chothia o Kabat H005, H023, y H084; y los residuos de EU H118, H119, H132, H134, H136, H137, H160, H162, H172, H239, H241, H267, H269, H270, H271, H272, H282, H286, H292, H293, H296, H298, H329, H330, H334, H335, H340, H355, H359, H386, H389, H404, H420, H421, H438, y H342.

30 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos L22 y L7 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia, y L152 de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

35 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos L043, L049, L056, L057, L060, L067, y L068 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y L109, L112, L114, L144, L153, L156, L157, L168, L184, L202, L203, y L206, de acuerdo con el esquema de numeración de EU. En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos L043, L049, L056, L057, L060, L067, y L068 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y L109, L112, L114, L144, L153, L156, L168, L184, L202, y L203, de acuerdo con el esquema de numeración de EU. En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos L049, L056, L057, L060, y L067 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y L109, L153, L202, y L203, de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

50 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H023 y H084 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H118, H119, H135, H136, H137, H160, H161, H162, H164, H195, H197, H219, H282, H289, H296, H330, H335, H361, H400, H404, H422, H440, H260, H267, H268, H272, H274, H292, H293, H297, H298, H303, H305, H332, H333, H334, H340, H341, H342, H343, H355, H362, H386, H392, H404, H424, H438, H442 y H443, de acuerdo con el esquema de numeración de EU. En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H023 y H084 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H118, H119, H135, H136, H137, H160, H161, H162, H164, H195, H197, H219, H282, H296, H335, H361, H422, H440, H267, H272, H274, H293, H297, H298, H303, H305, H334, H340, H341, H342, H343, H355, H362, H392, H404, H424, H438, H442 y H443, de acuerdo con el esquema de numeración de EU. En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H023 y H084 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H118, H119, H135, H136, H137, H160, H161, H162, H195, H197, H219, H282, H296, H422, H440, H267, H272, H293, H297, H298, H303, H305, H334, H340, H341, H342, H355, H392, H404, H424, H438, H442 y H443, de acuerdo con el esquema de numeración de EU. En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H023 y H084 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H118, H119, H135, H136, H160,

H162, H195, H219, H282, H296, H267, H293, H297, H298, H303, H305, H334, H340, H341, H392, y H438, H442, de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

5 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H042, H003, H007, H014, H016, H019, H025, H040, H043, H051, H052, H053, H056, H070, H082A, H098, H100, H110, y H112 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H121, H180, H184, H190, H192, H214, H216, H221, H222, H225, H227, H230, H231, H232, y H236, de acuerdo con el esquema de numeración de EU. En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H042, H003, H007, H014, H016, H019, H025, H040, H043, H052, H053, H056, H070, H082A, H100, H110, y H112 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H121, H180, H190, H192, H214, H216, H221, H222, H225, H227, H230, H231, H232, y H236, de acuerdo con el esquema de numeración de EU. En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H042, H003, H007, H014, H016, H019, H025, H040, H043, H052, H070, H100, H110, y H112 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H121, H180, H190, H192, H214, H216, H221, H222, H225, H227, H230, H231, H232, y H236, de acuerdo con el esquema de numeración de EU. En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H007, H014, H019, H025, H040, H043, H052, H070, H100, H110, y H112 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H121, H180, H214, H216, H222, H227, H230, H231, H232, y H236, de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

25 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H005, H023, H042, H065, H074, y H084 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H420, H421, H436, y H438 de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

35 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H005, H023, H074, y H084 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H239, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H359, H375, H386, H389, H392, H398, H420, H421, y H438 de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

40 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H023 y H074 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H119, H134, H135, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H375, H386, H392, H398, H420, H421, y H438 de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

50 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H042 y H065 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H138, H155, H174, H176, H177, H219, H238, H243, H262, H264, H265, H278, H356, H358, H360, H383, H384 y H436 de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

55 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H019, H025, H040, H052, y H071 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H117, H119, H124, H139, H183, H193, H224, H225, y H407 de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

60 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H019, H025, H040, H052, y H070 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H119, H121, H136, H180, H190, H222, H241, y H404 de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

65 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H025 y H040 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H119, H121, H136, H180, H190, H222, H241, y H404 de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

5 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos L043, L049, L056, L057, L060, L067, y L068 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y L109, L144, L153, L156, L184, L202, y L203 de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

10 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos L049, L056, L057, L060, y L067 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y L109, L153, L202, y L203 de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

15 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H019, H025, H051, H070, H098, H110, y H112 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H121, H136, H180, H187, H190, H214, H216, H221, y H222, de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

20 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos (-)L001, L007, L008, L016, L022, L063, L014, y L070 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y L138, L142, L143 y L152, de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

25 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos H019, H025, H051, H070, H077, H079, H098, H110, y H112 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y H121, H136, H180, H187, H190, H214, H216, H221, y H222, de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

30 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de los residuos (-)L001, L007, L008, L016, L022, L063, y L070 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia; y L138, L142, L143, L152 y L201, de acuerdo con el esquema de numeración de EU.

35 Las posiciones sitio-específicas también se pueden identificar en relación con las secuencias de aminoácido de las cadenas de polipéptido de un anticuerpo de referencia. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de referencia se proporciona en la sec. con núm. de ident.:1. En la cadena pesada de referencia, las posiciones sitio-específicas están en los residuos 407, 124, 183, 139, 25, 40, 119, 122, 193, 225, 19, 52, 71, 117 o 224. En otras palabras, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 407, 124, 183, 139, 25, 40, 119, 122, 193, 225, 19, 52, 71, 117 o 224 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1.

40 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 5, 23, 42, 66, 75, 88, 121, 122, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 158, 163, 165, 168, 175, 177, 179, 180, 194, 197, 222, 241, 242, 244, 246, 249, 265, 267, 268, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 281, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 337, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 358, 359, 361, 362, 363, 378, 386, 387, 389, 392, 395, 401, 407, 423, 424, 439 y 441 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1.

50 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 5, 23, 75, 88, 121, 122, 135, 137, 138, 139, 140, 142, 163, 165, 168, 175, 194, 197, 242, 244, 249, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 337, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 358, 362, 378, 389, 392, 395, 401, 407, 423, 424, y 441 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1.

55 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 5, 23, 88, 121, 122, 135, 137, 138, 139, 140, 163, 165, 168, 175, 242, 244, 270, 273, 274, 275, 285, 289, 295, 296, 299, 300, 301, 332, 333, 337, 338, 343, 345, 358, 362, 389, 407, 423, 424, y 441 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1.

60 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 5, 88, 121, 135, 139, 242, 296, 337, 358, 362, y 392 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1.

65 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos

- 5 no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 23, 75, 122, 137, 138, 140, 142, 163, 165, 168, 175, 194, 197, 244, 249, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 358, 378, 389, 395, 401, 407, 423, 424, y 441 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.
- 10 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 42, 66, 141, 158, 177, 179, 180, 222, 241, 246, 265, 267, 268, 281, 359, 361, 363, 386, 387, 407, y 439 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1.
- 15 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 295-304, 306, y 308 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.
- 20 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 23, 88, 121, 122, 138, 139, 140, 163, 164, 165, 167, 198, 200, 222, 285, 292, 299, 333, 338, 364, 403, 407, 425, 443, 263, 270, 271, 275, 277, 295, 296, 300, 301, 306, 308, 335, 336, 337, 343, 344, 345, 346, 358, 365, 389, 395, 407, 427, 441, 445, y 446 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.
- 25 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 23, 88, 121, 122, 138, 139, 140, 163, 164, 165, 167, 198, 200, 222, 285, 299, 338, 364, 425, 443, 270, 275, 277, 295, 296, 300, 301, 306, 308, 337, 343, 344, 345, 346, 358, 365, 395, 407, 427, 441, 445, y 446 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.
- 30 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 23, 88, 121, 122, 138, 139, 140, 163, 164, 165, 167, 198, 200, 222, 285, 299, 364, 425, 443, 270, 275, 296, 300, 301, 306, 308, 337, 343, 344, 345, 358, 365, 395, 407, 427, 441, 445, y 446 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1.
- 35 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 23, 88, 121, 122, 138, 139, 140, 163, 164, 165, 198, 200, 222, 285, 299, 364, 425, 443, 270, 275, 296, 300, 301, 306, 308, 337, 343, 344, 345, 358, 395, 407, 427, 441, 445, y 446 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.
- 40 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 23, 88, 121, 122, 138, 139, 163, 165, 198, 222, 285, 299, 270, 296, 300, 301, 306, 308, 337, 343, 344, 395, 407, y 441 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.
- 45 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 42, 3, 7, 14, 16, 19, 25, 40, 43, 51, 52, 54, 57, 71, 84, 102, 104, 114, 119, 124, 183, 187, 193, 195, 217, 219, 224, 225, 228, 230, 233, 234, 235 y 239 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.
- 50 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 42, 3, 7, 14, 16, 19, 25, 40, 43, 52, 54, 57, 71, 84, 104, 114, 119, 124, 183, 193, 195, 217, 219, 224, 225, 228, 230, 233, 234, 235 y 239 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.
- 55 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 7, 14, 19, 25, 40, 43, 52, 71, 104, 114, 119, 124, 183, 195, 217, 219, 230, 233, 234, 235, y 239 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1.
- 60 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 22, 7 y 152 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.
- 65 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 27, 45, 58, 63, 65, 66, 70, 77, 79, 107, 138, 142, 143, 152, 171, 182, 188, 199, y 201 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.

5 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 27, 45, 58, 63, 65, 66, 70, 77, 79, 107, 142, 143, 152, 171, 182, 188, 199, y 201 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.

10 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 27, 45, 58, 63, 65, 66, 70, 77, 79, 107, 142, 152, 171, 182, 188, y 199 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.

15 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 5, 7, 8, 16, 17, 18, 20, 22, 27, 45, 58, 63, 77, 79, 107, 142, 152, 182, 188, y 199 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.

20 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 16, 63, y 199 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.

25 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 19, 25, 51, 71, 102, 114, 119, 124, 139, 183, 187, 193, 217, 219, 224, y 225 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.

En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 7, 8, 16, 22, 63, 14, 70, 138, 142, 143 y 152 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.

30 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 19, 25, 51, 71, 78, 80, 102, 114, 119, 124, 139, 183, 187, 193, 217, 219, 224, y 225 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.

35 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 7, 8, 16, 22, 63, 70, 138, 142, 143, 152, y 201 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.

40 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 43, 49, 56, 57, 60, 67, 68, 109, 112, 114, 144, 153, 156, 157, 168, 184, 202, 203, y 206 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.

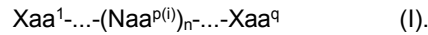
45 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 43, 49, 56, 57, 60, 67, 68, 109, 112, 144, 153, 156, 168, 184, 202, y 203 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.

50 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 43, 49, 56, 57, 60, 67, 68, 109, 144, 153, 156, 184, 202, y 203 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.

55 En ciertos ejemplos, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 49, 56, 57, 60, 67, 109, 153, 202, y 203 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.

60 En otras palabras, En la presente descripción se proporcionan anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos no naturales en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 407, 124, 183, 139, 25, 40, 119, 193, 225, 19, 52, 71, 117 o 224 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1 y en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 22, 7 y 152 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.

65 En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena de polipéptido que puede describirse por la siguiente Fórmula (I):



5

En la Fórmula (I), cada Xaa representa un aminoácido en la cadena de polipéptido de cualquier identidad. En otras palabras, cada Xaa puede ser cualquier aminoácido, típicamente cualquier aminoácido de origen natural, o una variante de este. El superíndice a la derecha de cada Xaa representa la posición del aminoácido dentro de la secuencia primaria de la cadena de polipéptido. Xaa¹ representa el primer aminoácido, o el aminoácido N-terminal en la cadena de polipéptido, y Xaa^q representa el último aminoácido o el aminoácido C-terminal en la cadena de polipéptido. La variable q es un número entero que es igual al número total de aminoácidos en la cadena de polipéptido. Cada Naa representa un aminoácido no natural dentro de la cadena de polipéptido. Los aminoácidos útiles no naturales se describen en las secciones más abajo. El número entero n representa el número de aminoácidos no naturales en la cadena de polipéptido. En ejemplos típicos, n es un número entero mayor que 1. Cada número entero p(i) es mayor que 1 y menor que q, y la variable i es un número entero que varía de 1 a n. Cada número entero p(i) representa una ubicación sitio-específica en la secuencia de aminoácidos para el Naa correspondiente. Cada ubicación sitio-específica p(i) es óptima para la sustitución de un aminoácido de origen natural con un aminoácido no natural, tal como Naa^{p(i)}, de acuerdo con las técnicas descritas en la presente.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

En la presente descripción, en ciertos ejemplos, se proporcionan, además, variantes conservadoramente modificadas de los anticuerpos anteriores. Las variantes modificadas conservadoramente de un anticuerpo incluyen una o más inserciones, deleciones o sustituciones que no afectan la estructura y/o función del anticuerpo cuando se evalúa por el experto en la técnica. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen 20 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen 15 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen 10 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen 9 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen 8 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen 7 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen 6 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen 5 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen 4 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen 3 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen 2 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen 1 inserción, deleción o sustitución de aminoácidos. En ejemplos particulares, las sustituciones son conservadoras, al sustituir un aminoácido dentro de la misma clase, como se describió anteriormente.

En ciertos ejemplos, los anticuerpos pueden modificarse para modular la estructura, estabilidad y/o actividad. En tales ejemplos, las modificaciones pueden ser conservadoras u otras distintas a las conservadoras. Las modificaciones necesitan solamente ser las adecuadas para el especialista que lleva a cabo los métodos y que usa la composición descrita en la presente. En ciertos ejemplos, las modificaciones disminuyen pero no eliminan la afinidad de unión al antígeno. En ciertos ejemplos, las modificaciones aumentan la afinidad de unión al antígeno. En ciertos ejemplos, las modificaciones mejoran la estructura o estabilidad del anticuerpo. En ciertos ejemplos, las modificaciones reducen pero no eliminan la estructura o estabilidad del anticuerpo. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas incluyen 20 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas incluyen 15 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas incluyen 10 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas incluyen 9 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas incluyen 8 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas incluyen 7 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas incluyen 6 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas incluyen 5 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas incluyen 4 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas incluyen 3 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas incluyen 2 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, las variantes modificadas incluyen 1 inserción, deleción o sustitución de aminoácidos.

65

Dentro del alcance están también las variantes modificadas postraduccionales. Cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente descripción puede modificarse postraduccionales de cualquier manera reconocida por los expertos en la técnica. Las modificaciones postraduccionales típicas para anticuerpos incluyen enlace disulfuro entre cadenas, enlace disulfuro intracatenario, glicosilación ligada a N y proteólisis. Además, en la presente descripción se proporcionan otros anticuerpos modificados postraduccionales que tienen modificaciones tales como

fosforilación, glicosilación ligada a O, metilación, acetilación, lipidación, anclaje de GPI, miristoilación y prenilación. La modificación postraduccional puede ocurrir durante la producción, *in vivo*, *in vitro* o de cualquier otra forma. En ciertos ejemplos, la modificación postraduccional puede ser una modificación intencional por un especialista, por ejemplo, usando los métodos proporcionado en la presente descripción.

5 Dentro del alcance se incluyen además los anticuerpos fusionados a otros péptidos o polipéptidos. Las fusiones ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, un anticuerpo de metionilo en el cual una metionina se enlaza al N-terminal del anticuerpo lo que resulta de la expresión recombinante, fusiones con el propósito de la purificación (que incluyen pero no se limitan a, poli-histidina o epítopos de afinidad), fusiones con el propósito de unirse a otras moléculas biológicamente activas, fusiones con péptidos de unión a la albúmina sérica, y fusiones con proteínas séricas tal como la albúmina sérica. Los anticuerpos pueden comprender secuencias de escisión de proteasa, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpos (que incluyen pero no se limitan a, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (que incluyen pero no se limitan a, FLAG, poli-His, GST, etc.). Los anticuerpos pueden comprender, además, moléculas enlazadas (que incluyen pero no se limitan a, biotina) que mejoran la detección (que incluyen pero no se limitan a, GFP), purificación u otras características del anticuerpo. En ciertos ejemplos, los anticuerpos comprenden una secuencia de afinidad C-terminal que facilita la purificación de los anticuerpos de longitud completa. En ciertos ejemplos, tal secuencia de afinidad C-terminal es una secuencia de poli-His, por ejemplo, una secuencia 6-His.

20 El anticuerpo puede tener cualquier forma de anticuerpo reconocida por los expertos en la técnica. El anticuerpo puede comprender una sola cadena polipeptídica: una sola cadena pesada o una sola cadena ligera. El anticuerpo también puede formar multímeros que serán reconocidos por los expertos en la técnica e incluyen homodímeros, heterodímeros, homomultímeros, y heteromultímeros. Estos multímeros pueden estar enlazados o no enlazados. Los enlaces útiles incluyen enlaces disulfuro entre cadenas típicas para moléculas de anticuerpo. Los multímeros pueden estar enlazados por otros aminoácidos, que incluyen los aminoácidos no naturales introducidos de acuerdo con la presente descripción. El anticuerpo puede ser una inmunoglobulina como de cualquier clase o subclase incluyendo IgA, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM. El anticuerpo puede ser de la forma de cualquier fragmento de anticuerpo que incluye Fv, Fc, Fab, y (Fab')₂ y scFv.

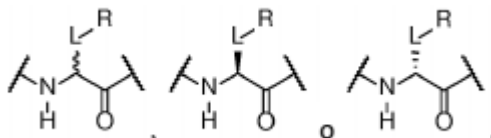
30 En la presente descripción, también se proporcionan anticuerpos que están conjugados con una o más fracciones de conjugación. La fracción de conjugación puede ser cualquier fracción de conjugación considerada útil por el experto en la técnica. Por ejemplo, la fracción de conjugación puede ser un polímero, tal como polietilenglicol, que puede mejorar la estabilidad del anticuerpo *in vitro* o *in vivo*. La fracción de conjugación puede tener actividad terapéutica, produciendo de esta manera un conjugado anticuerpo-fármaco. La fracción de conjugación puede ser una carga molecular que es perjudicial para las células objetivo. La fracción de conjugación puede ser una etiqueta útil para la detección o el diagnóstico. En ciertos ejemplos, la fracción de conjugación se enlaza al anticuerpo a través de un enlace covalente directo. En ciertos ejemplos, la fracción de conjugación se enlaza al anticuerpo a través de un enlazador. En ejemplos ventajosos, la fracción de conjugación o el enlazador se une a través de los aminoácidos no naturales del anticuerpo. Las fracciones de conjugación y los enlazadores ilustrativos se describen en las secciones más abajo.

40 Aminoácidos no naturales

El aminoácido no natural puede ser cualquier aminoácido no natural conocido por los expertos en la técnica. En algunos ejemplos, el aminoácido no codificado naturalmente comprende un grupo funcional. El grupo funcional puede ser cualquier grupo funcional conocido por los expertos en la técnica. En ciertos ejemplos, el grupo funcional es una etiqueta, un grupo polar, un grupo no polar o un grupo reactivo.

Los grupos reactivos son particularmente ventajosos para enlazar otros grupos funcionales al anticuerpo en la posición sitio-específica de la cadena de anticuerpo. En ciertos ejemplos, el grupo reactivo se selecciona del grupo que consiste en amino, carboxi, acetilo, hidrazino, hidrazido, semicarbazido, sulfanilo, azido, tetrazina y alquinilo.

50 En ciertos ejemplos, el residuo de aminoácido es de acuerdo con cualquiera de las siguientes fórmulas:



55 Los expertos en la técnica reconocerán que los anticuerpos se componen generalmente de aminoácidos L. Sin embargo, con los aminoácidos no naturales, los presentes métodos y composiciones proporcionan al especialista la capacidad de usar aminoácidos L, D o racémicos no naturales en las posiciones sitio-específicas. En ciertos ejemplos, los aminoácidos no naturales descritos en la presente incluyen versiones D de los aminoácidos naturales y versiones racémicas de los aminoácidos naturales.

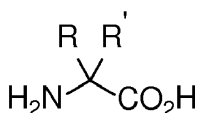
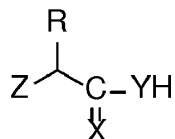
En las fórmulas anteriores, las líneas onduladas indican enlaces que conectan con el resto de las cadenas de polipéptido de los anticuerpos. Estos aminoácidos no naturales pueden incorporarse en cadenas de polipéptidos justo como los aminoácidos naturales se incorporan en las mismas cadenas de polipéptidos. En ciertos ejemplos, los aminoácidos no naturales se incorporan en la cadena de polipéptido a través de enlaces amida como se indica en las fórmulas.

En las fórmulas anteriores, R designa cualquier grupo funcional sin limitación, siempre y cuando el residuo de aminoácido no sea idéntico a un residuo de aminoácido natural. En ciertos ejemplos, R puede ser un grupo hidrofóbico, un grupo hidrofílico, un grupo polar, un grupo ácido, un grupo básico, un grupo quelante, un grupo reactivo, una fracción terapéutica o una fracción marcadora. En ciertos ejemplos, R se selecciona del grupo que consiste en $R^1NR^2R^3$, $R^1C(=O)R^2$, $R^1C(=O)OR^2$, R^1N_3 , $R^1C(\equiv CH)$. En estos ejemplos, R^1 se selecciona del grupo que consiste en un enlace, alquileo, heteroalquileo, arileno, heteroarileno. R^2 y R^3 son cada uno independientemente seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y heteroalquilo.

En algunos ejemplos, los aminoácidos no codificados naturalmente incluyen grupos funcionales de cadena lateral que reaccionan eficiente y selectivamente con grupos funcionales que no se encuentran en los 20 aminoácidos comunes (que incluyen pero no se limitan a, grupos azido, cetona, aldehído y aminooxi) para formar conjugados estables. Por ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno, que incluye un aminoácido no codificado naturalmente que contiene un grupo funcional azido puede hacerse reaccionar con un polímero (que incluye pero no se limitan a, poli(etilenglicol)) o, alternativamente, un segundo polipéptido que contiene una fracción alquino para formar un conjugado estable que resulta de la reacción selectiva de la azida y los grupos funcionales alquino para formar un producto de cicloadición [3+2] de Huisgen. Un polipéptido de unión a antígeno que incluye un aminoácido no codificado naturalmente que contiene un grupo funcional tetrazina puede hacerse reaccionar con un polímero (que incluye pero no se limita a, poli(etilenglicol)) que contiene una fracción de alqueno tensionado para formar un conjugado estable que resulta de la reacción selectiva de la tetrazina y el alqueno tensionado. Alternativamente, un segundo polipéptido que contiene una fracción de alqueno tensionado puede hacerse reaccionar con el aminoácido que contiene la funcionalidad tetrazina para formar un conjugado estable que resulta de la reacción selectiva de la tetrazina y el alqueno tensionado.

Los aminoácidos no codificados naturalmente ilustrativos que pueden ser adecuados para uso en los métodos descritos actualmente y que son útiles para reacciones con polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, aquellos con grupos reactivos carbonilo, aminooxi, hidrazina, hidrazida, semicarbazida, azida y alquino. En algunos ejemplos, los aminoácidos no codificados naturalmente comprenden una fracción sacárido. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen N-acetil-L-glucosaminil-L-serina, N-acetil-L-galactosaminil-L-serina, N-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, N-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y O-mannosaminil-L-serina. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen, además, ejemplos donde el enlace O- o N- de origen natural entre el aminoácido y el sacárido se reemplaza por un enlace covalente que no se encuentra comúnmente en la naturaleza, que incluye pero no se limita a, un alqueno, una oxima, un tioéter, una amida y similares. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen, además, sacáridos que no se encuentran comúnmente en las proteínas de origen natural tal como 2-deoxi-glucosa, 2-deoxigalactosa y similares.

Muchos de los aminoácidos no codificados naturalmente proporcionados en la presente se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo., Estados Unidos), Novabiochem (una división de EMD Biosciences, Darmstadt, Alemania), o Peptech (Burlington, Mass., Estados Unidos). Aquellos que no están disponibles comercialmente se sintetizan opcionalmente como se proporciona en la presente o usando métodos estándares conocidos por los expertos en la técnica. Para las técnicas de síntesis orgánica, ver, por ejemplo, Organic Chemistry de Fessenden y Fessenden, (1982, Segunda Edición, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry de March (Tercera Edición, 1985, Wiley and Sons, Nueva York); y Advanced Organic Chemistry de Carey y Sundberg (Tercera Edición, Partes A y B, 1990, Plenum Press, Nueva York). Ver, además, las publicaciones de las solicitudes de patente de Estados Unidos 2003/0082575 y 2003/0108885. Además de los aminoácidos no naturales que contienen nuevas cadenas laterales, los aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso también comprenden opcionalmente estructuras de esqueleto modificadas, que incluyen, pero no se limitan a, las ilustradas por las estructuras de Fórmula II y III:



en donde Z típicamente comprende OH, NH₂, SH, NH-R', o S-R'; X y Y, que pueden ser el mismo o diferentes, típicamente comprenden S u O, y R y R', que son opcionalmente el mismo o diferentes, se seleccionan típicamente de

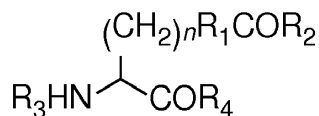
la misma lista de constituyentes para el grupo R descrito anteriormente para los aminoácidos no naturales que tienen la Fórmula I así como hidrógeno. Por ejemplo, los aminoácidos no naturales de la presente descripción opcionalmente comprenden sustituciones o el grupo carboxilo o como se ilustra por las Fórmulas II y III. Los aminoácidos no naturales de este tipo incluyen, pero no se limitan a, α -hidroxi ácidos, α -tioácidos, α -aminotiocarboxilatos, que incluyen pero no se limitan a, aquellos con cadenas laterales que corresponden a los veinte aminoácidos naturales comunes o con cadenas laterales no naturales. Además, las sustituciones en el carbono α opcionalmente incluyen, pero no se limitan a, los aminoácidos L, D, o α - α -disustituido tal como D-glutamato, D-alanina, D-metil-O-tirosina, ácido aminobutírico, y similares. Otras alternativas estructurales incluyen aminoácidos cíclicos tales como análogos de prolina así como análogos de prolina de 3, 4, 6, 7, 8, y 9 miembros anulares, aminoácidos P y y tales como β -alanina sustituida y ácido γ -amino butírico.

Muchos aminoácidos no naturales se basan en aminoácidos naturales, tales como tirosina, glutamina, fenilalanina, y similares, y son adecuados para su uso en la presente descripción. Los análogos de tirosina incluyen, pero no se limitan a, tirosinas para-sustituidas, tirosinas orto-sustituidas, y tirosinas meta sustituidas, donde la tirosina sustituida comprende, incluye pero no se limita a, un grupo ceto (que incluye pero no se limita a, un grupo acetilo), un grupo benzoilo, un grupo amino, una hidrazina, una hidroxiamina, un grupo tiol, un grupo carboxi, un grupo isopropilo, un grupo metilo, un hidrocarburo de C₆-C₂₀ de cadena lineal o ramificada, un hidrocarburo saturado o insaturado, un grupo O-metilo, un grupo poliéter, un grupo nitro, un grupo alquilino o similares. Además, se contemplan múltiples anillos arilo sustituidos. Los análogos de glutamina que pueden ser adecuados para usar en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, α -hidroxi derivados, derivados γ -sustituidos, derivados cíclicos, y derivados de glutamina sustituidos en amida. Ejemplos de análogos de fenilalanina que pueden ser adecuados para usar en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, fenilalaninas para-sustituidas, fenilalaninas orto-sustituidas, y fenilalaninas meta-sustituidas, donde el sustituyente comprende, e incluye pero no se limita a, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo metilo, un grupo alilo, un aldehído, un azido, un yodo, un bromo, un grupo ceto (que incluye pero no se limita a, un grupo acetilo), un benzoilo, un grupo alquilino, o similares. Los ejemplos específicos de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, una p-acetil-L-fenilalanina, una O-metil-L-tirosina, una L-3-(2-naftil)alanina, una 3-metil-fenilalanina, una O-4-alil-L-tirosina, una 4-propil-L-tirosina, una tri-O-acetil-GlcNAc β -serina, una L-Dopa, una fenilalanina fluorada, una isopropil-L-fenilalanina, una p-azido-L-fenilalanina, una p-acil-L-fenilalanina, una p-benzoil-L-fenilalanina, una L-fosfoserina, una fosfonoserina, una fosfonotirosina, una p-yodo-fenilalanina, una p-bromofenilalanina, una p-amino-L-fenilalanina, una isopropil-L-fenilalanina, y una p-propargiloxi-fenilalanina, y similares. Ejemplos de estructuras de una variedad de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente descripción se proporcionan en, por ejemplo, el documento WO 2002/085923 titulado "*In vivo* incorporation of unnatural amino acids". Ver además Kiick y otros, (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24, para análogos de metionina adicionales.

Muchos de los aminoácidos no naturales adecuados para su uso en la presente descripción están comercialmente disponibles, por ejemplo, de Sigma (Estados Unidos) o Aldrich (Milwaukee, Wis., Estados Unidos). Aquellos que no están disponibles comercialmente se sintetizan opcionalmente como se proporciona en la presente o como se proporciona en varias publicaciones o usando métodos estándares conocidos para los expertos en la técnica. Para las técnicas de síntesis orgánica, ver, por ejemplo, Organic Chemistry de Fessenden y Fessenden, (1982, Segunda Edición, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry de March (Tercera Edición, 1985, Wiley and Sons, Nueva York); y Advanced Organic Chemistry de Carey y Sundberg (Tercera Edición, Partes A y B, 1990, Plenum Press, Nueva York). Publicaciones adicionales que describen la síntesis de aminoácidos no naturales incluyen, por ejemplo, el documento WO 2002/085923 titulado "*In vivo* incorporation of Unnatural Amino Acids;" Matsoukas y otros, (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F. E. y Kidd, D. A. A. (1949) A New Síntesis of Glutamine and of γ -Dipeptides of Glutamic Acid from phthalated Intermediates. J. Chem. Soc., 3315-3319; Friedman, O. M. y Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J. C. y otros (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4 [[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). J. Org. Chem. 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. y Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A. M. P. y Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B. D. y Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem. 1989:1859-1866; Barton y otros, (1987) Synthesis of Novel α -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- α -Amino-Adipic Acids, L- α -aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron Lett. 43:4297-4308; y, Subasinghe y otros, (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem. 35:4602-7. Ver además, la publicación de la patente US 7642085.

Los aminoácidos con un grupo carbonilo reactivo permiten una variedad de reacciones para enlazar moléculas (que incluyen pero no se limitan a, PEG u otras moléculas solubles en agua) a través de la adición nucleofílica o reacciones de condensación aldólica, entre otras.

Los aminoácidos ilustrativos que contienen carbonilos pueden representarse como sigue:



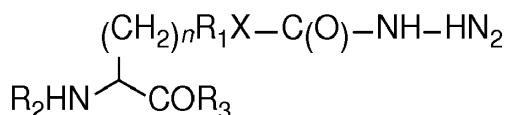
5 en donde n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido, o arilo sustituido; R₂ es H, alquilo, arilo, alquilo sustituido, y arilo sustituido; y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del terminal amino, y R₄ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del terminal carboxi. En algunos ejemplos, n es 1, R₁ es fenilo y R₂ es un alquilo simple (es decir, metilo, etilo, o propilo) y la fracción cetona se posiciona en la posición para en relación con la cadena lateral del alquilo. En algunos ejemplos, n es 1, R₁ es fenilo y R₂ es un alquilo simple (es decir, metilo, etilo, o propilo) y la fracción cetona se posiciona en la posición meta en relación con la cadena lateral del alquilo.

10 En la presente descripción, un aminoácido no codificado naturalmente que porta grupos hidroxilo y amino adyacentes puede incorporarse en el polipéptido como una funcionalidad aldehído "enmascarada". Por ejemplo, 5-hidroxisina tiene un grupo hidroxilo adyacente a la amina epsilon. Las condiciones de reacción para generar el aldehído típicamente implica la adición de un exceso molar de metaperyodato sódico 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 un exceso molar de 1.5 de meta-peryodato de sodio a una solución tamponada del polipéptido, seguido de incubación durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad. Ver, por ejemplo la patente de los Estados Unidos núm. 6,423,685.

20 La funcionalidad carbonilo puede reaccionar de forma selectiva con un reactivo que contiene hidrazina, hidrazida, hidroxilamina, o semicarbazida en condiciones suaves en solución acuosa para formar los enlaces correspondientes de hidrazona, oxima o semicarbazona, respectivamente, que son estables en condiciones fisiológicas. Ver, por ejemplo, Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995). Además, la reactividad única del grupo carbonilo permite la modificación selectiva en presencia de otras cadenas laterales de aminoácidos. Ver, por ejemplo, Cornish, V. W., y otros, 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).

30 Los aminoácidos no codificados naturalmente que contienen un grupo nucleofílico, tal como una hidrazina, hidrazida o semicarbazida, permiten la reacción con una variedad de grupos electrofílicos para formar conjugados (que incluyen pero sin limitaciones, con PEG u otros polímeros solubles en agua).

Ejemplos de aminoácidos que contienen hidracina, hidrazida o semicarbazida pueden representarse de la siguiente manera:



35 en donde n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido, o arilo sustituido o no está presente; X, es O, N, o S o no está presente; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del terminal amino, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del terminal carboxi.

40 En algunos ejemplos, n es 4, R₁ no está presente, y X es N. En algunos ejemplos, n es 2, R₁ no está presente, y X no está presente. En algunos ejemplos, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, y el átomo de oxígeno se posiciona en la posición para en relación con el grupo alifático en el anillo de arilo.

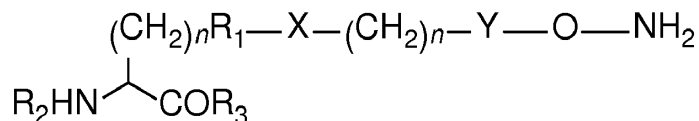
45 Los aminoácidos que contienen hidrazida, hidrazina, y semicarbazida están disponibles de fuentes comerciales. Por ejemplo, la L-glutamato-γ-hidrazida está disponible de Sigma Chemical (St. Louis, Mo.). Otros aminoácidos no disponibles comercialmente pueden prepararse por un experto en la técnica. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 6,281,211.

50 Los polipéptidos que contienen aminoácidos no codificados naturalmente que portan funcionalidades hidrazida, hidrazina o semicarbazida pueden reaccionar de manera eficiente y selectiva con una variedad de moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Ver, por ejemplo, Shao, J. y Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995). La reactividad única de los grupos funcionales de hidrazida, hidrazina y semicarbazida los hace significativamente más reactivos hacia los aldehídos, cetonas y otros grupos electrofílicos en comparación con los grupos nucleófilos presentes en los 20 aminoácidos comunes (que incluyen, pero no se limitan al grupo hidroxilo de la serina o treonina o los grupos amino de la lisina y el N-terminal).

55 Los aminoácidos no codificados naturalmente que contienen un grupo aminooxi (conocidos además como hidroxilamina) permiten la reacción con una variedad de grupos electrofílicos para formar conjugados (que incluyen pero sin limitaciones, con PEG u otros polímeros solubles en agua). Al igual que las hidrazinas, hidrazidas y semicarbazidas, la

nucleofilicidad mejorada del grupo aminoóxilo le permite reaccionar de manera eficiente y selectiva con una variedad de moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Ver, por ejemplo, Shao, J. y Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995); H. Hang y C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34: 727-736 (2001). Mientras que el resultado de la reacción con un grupo hidrazina es la hidrazona correspondiente, sin embargo, una oxima resulta generalmente de la reacción de un grupo aminoóxilo con un grupo que contiene carbonilo tal como una cetona.

Los aminoácidos ilustrativos que contienen grupos aminoóxi pueden representarse como sigue:



10

en donde n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido, o arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10; Y=C(O) o no está presente; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del terminal amino, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del terminal carboxi. En algunos ejemplos, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, m es 1, y Y está presente. En algunos ejemplos, n es 2, R₁ y X no están presentes, m es 0, y Y no está presente.

15

Los aminoácidos que contienen aminoóxi pueden prepararse a partir de precursores de aminoácidos fácilmente disponibles (homoserina, serina y treonina). Ver, por ejemplo, M. Carrasco y R. Brown, J. Org. Chem. 68: 8853-8858 (2003). Ciertos aminoácidos que contienen aminoóxi, tales como ácido L-2-amino-4-(aminoóxi)butírico, se han aislado a partir de fuentes naturales (Rosenthal, G. y otros, Life Sci. 60: 1635-1641 (1997)). Otros aminoácidos que contienen aminoóxi pueden prepararse por un experto en la técnica.

20

La reactividad única de los grupos funcionales azida y alquino los hace extremadamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y otras moléculas biológicas. Las azidas orgánicas, particularmente las azidas alifáticas y los alquinos son generalmente estables frente a las condiciones químicas reactivas comunes. En particular, tanto la azida como los grupos funcionales alquino son inertes frente a las cadenas laterales (es decir, grupos R) de los 20 aminoácidos comunes encontrados en polipéptidos de origen natural. Sin embargo, cuando se aproximan, se revela la naturaleza "accionada por resorte" de los grupos azida y alquino y reaccionan de forma selectiva y eficiente a través de la reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen para generar el triazol correspondiente. Ver, por ejemplo, Chin J., y otros, Science 301:964-7 (2003); Wang, Q., y otros, J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., y otros, J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002).

25

30

Debido a que la reacción de cicloadición de Huisgen implica una reacción de cicloadición selectiva (ver, por ejemplo, Padwa, A., en COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), pág. 1069-1109; Huisgen, R. en 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY, (ed. Padwa, A., 1984), pág. 1-176) en lugar de una sustitución nucleofílica, la incorporación de aminoácidos no codificados naturalmente que portan cadenas laterales que contienen azida y alquino permite que los polipéptidos resultantes se modifiquen selectivamente en la posición del aminoácido no codificado de forma natural. La reacción de cicloadición que implica un anticuerpo que contiene alquino o azida se puede llevar a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas mediante la adición de Cu(II) (que incluye, pero no se limita a, en la forma de una cantidad catalítica de CuSO₄) en presencia de un agente reductor para reducir el Cu(II) a Cu(I), *in situ*, en cantidad catalítica. Ver, por ejemplo, Wang, Q., y otros, J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Tornøe, C. W., y otros, J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, y otros, Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002). Ejemplos de agentes reductores incluyen, pero no se limitan a, ascorbato, cobre metálico, quinina, hidroquinona, vitamina K, glutatión, cisteína, Fe²⁺, Co²⁺, y un potencial eléctrico aplicado.

35

40

45

En algunos casos, cuando se desea una reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen entre una azida y un alquino, el polipéptido de unión a antígeno comprende un aminoácido no codificado naturalmente que comprende una fracción alquino y el polímero soluble en agua que se unirá al aminoácido comprende una fracción azida. Alternativamente, la reacción inversa (es decir, con la fracción azida en el aminoácido y la fracción alquino presente en el polímero soluble en agua) también puede realizarse.

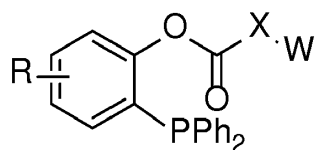
50

El grupo funcional azida también puede hacerse reaccionar selectivamente con un polímero soluble en agua que contiene un éster de arilo y funcionalizarse apropiadamente con un resto de arilfosfina para generar un enlace amida. El grupo aril fosfina reduce la azida *in situ* y la amina resultante reacciona de manera eficiente con un enlace éster proximal para generar la amida correspondiente. Ver, por ejemplo, E. Saxon y C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000). El aminoácido que contiene azida puede ser una alquilazida (que incluye, pero no se limita a, ácido 2-amino-6-azido-1-hexanoico) o una arilazida (p-azido-fenilalanina)

55

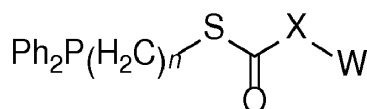
Los ejemplos de polímeros solubles en agua que contienen un éster de arilo y una fracción de fosfina se pueden representar de la siguiente manera:

60



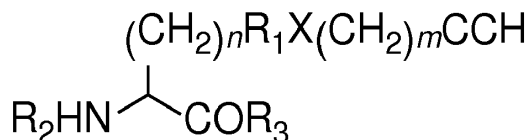
5 en donde X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, W es un polímero soluble en agua y R puede ser H, grupos alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido. Los grupos R ilustrativos incluyen pero no se limitan a -CH₂, -C(CH₃)₃, -OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -CN y -NO₂. R', R'', R''' y R'''' cada uno independientemente se refiere a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, que incluyen pero no se limitan a, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la presente descripción incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como son cada uno grupos R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R'' se unen al mismo átomo de nitrógeno, estos pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6, o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' incluye, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir del análisis anterior de los sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos de hidrógeno, tales como haloalquilo (que incluye pero no se limita a, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (que incluye pero no se limita a, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, y similares).

El grupo funcional azida también se puede hacer reaccionar selectivamente con un polímero soluble en agua que contiene un tioéster y funcionalizado apropiadamente con una fracción de aril fosfina para generar un enlace amida. El grupo aril fosfina reduce la azida in situ y la amina resultante reacciona de manera eficiente con el enlace tioéster para generar la amida correspondiente. Los ejemplos de polímeros solubles en agua que contienen un tioéster y una fracción de fosfina se pueden representar de la siguiente manera:



25 en donde n es 1-10; X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, y W es un polímero soluble en agua.

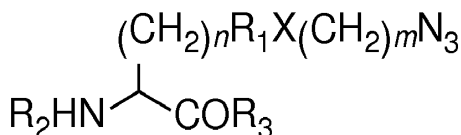
Los aminoácidos ilustrativos que contienen alquino pueden representarse como sigue:



30 en donde n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido, o arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10, R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del terminal amino, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del terminal carboxi. En algunos ejemplos, n es 1, R₁ es fenilo, X no está presente, m es 0 y la fracción acetileno se posiciona en la posición para en relación con la cadena lateral del alquilo. En algunos ejemplos, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, m es 1 y el grupo propargilo se posiciona en la posición para en relación con la cadena lateral del alquilo (es decir, O-propargil-tirosina). En algunos ejemplos, n es 1, R₁ y X no están presentes y m es 0 (es decir, proparilglicina).

40 Los aminoácidos que contienen alquino están comercialmente disponibles. Por ejemplo, la propargilglicina está comercialmente disponible de Peptech (Burlington, Mass.). Alternativamente, los aminoácidos que contienen alquino pueden prepararse de acuerdo con métodos estándares. Por ejemplo, la p-propargiloxifenilalanina puede sintetizarse, por ejemplo, como se describe en Deiters, A., y otros, J. Am. Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003), y 4-alquil-L-fenilalanina puede sintetizarse como se describe en Kayser, B., y otros, Tetrahedron 53(7): 2475-2484 (1997). Otros aminoácidos que contienen alquino pueden prepararse por un experto en la técnica.

Los aminoácidos que contienen azida ilustrativos pueden representarse como sigue:



50 en donde n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido, arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está

presente; m es 0-10; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del terminal amino, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del terminal carboxi. En algunos ejemplos, n es 1, R₁ es fenilo, X no está presente, m es 0 y la fracción de azida se posiciona en la posición para en relación con la cadena lateral del alquilo. En algunos ejemplos, n es 0-4 y R₁ y X no están presentes, y m=0. En algunos ejemplos, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, m es 2 y la fracción P-azidoetoxi se posiciona en la posición para en relación con la cadena lateral del alquilo.

Los aminoácidos que contienen azida están disponibles de fuentes comerciales. Por ejemplo, la 4-azidofenilalanina puede obtenerse de Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, Ill.). Para aquellos aminoácidos que contienen azida que no están disponibles comercialmente, el grupo azida puede prepararse relativamente fácil usando métodos estándares conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen pero no se limitan a, mediante el desplazamiento de un grupo saliente adecuado (que incluye, pero no se limita a, haluro, mesilato, tosilato) o mediante la apertura de una lactona adecuadamente protegida. Ver, por ejemplo, *Advanced Organic Chemistry* de March (Tercera Edición, 1985, Wiley and Sons, Nueva York).

La reactividad única de los grupos funcionales aminotiol beta-sustituídos los hace extremadamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y otras moléculas biológicas que contienen grupos aldehído a través de la formación de la tiazolidina. Ver, por ejemplo, J. Shao y J. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117 (14) 3893-3899. En algunos ejemplos, los aminoácidos de aminotiol beta-sustituídos pueden incorporarse en anticuerpos y hacerse reaccionar después con polímeros solubles en agua que comprenden una funcionalidad aldehído. En algunos ejemplos, un polímero soluble en agua, fármaco conjugado u otra carga puede acoplarse a un polipéptido de anticuerpo que comprende un aminoácido de aminotiol beta-sustituído a través de la formación de la tiazolidina.

Los ejemplos particulares de aminoácidos no naturales útiles incluyen, pero no se limitan a, p-acetil-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-allil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAc b-serina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfotirosina, p-yodo-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, y p-propargiloxi-fenilalanina. Ejemplos útiles adicionales incluyen N-acetil-L-glucosaminil-L-serina, N-acetil-L-galactosaminil-L-serina, N-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, N-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y O-manosaminil-L-serina.

En ejemplos particulares, los aminoácidos no naturales se seleccionan de p-acetil-fenilalanina, p-etinil-fenilalanina, p-propargiloxifenilalanina, y p-azido-fenilalanina. Un aminoácido no natural particularmente útil es p-azido fenilalanina. Este residuo de aminoácido es conocido por los expertos en la técnica por facilitar reacciones de cicloadición [3+2] de Huisgen (también llamadas reacciones químicas "click"), por ejemplo, con los compuestos que portan grupos alquínilo. Esta reacción permite a un experto en la técnica conjugar rápida y fácilmente al anticuerpo el aminoácido no natural en la ubicación sitio específica.

En ciertos ejemplos, el primer grupo reactivo es una fracción alquínilo (que incluye pero no se limita a, p-propargiloxifenilalanina en el aminoácido no natural, donde el grupo propargilo se refiere algunas veces como una fracción acetileno) y el segundo grupo reactivo es una fracción azido, y puede usarse la química de cicloadición [3+2]. En ciertos ejemplos, el primer grupo reactivo es la fracción azido (que incluye pero no se limita a, p-azido-L-fenilalanina en el aminoácido no natural) y el segundo grupo reactivo es la fracción alquínilo.

En las fórmulas anteriores, cada L representa un enlazador divalente. El enlazador divalente puede ser cualquier enlazador divalente conocido por los expertos en la técnica. Generalmente, el enlazador divalente es capaz de formar enlaces covalentes a la fracción R funcional y el carbón alfa del aminoácido no natural. Enlazadores divalentes útiles son un enlace, alquilenos, alquilenos sustituidos, heteroalquilenos, heteroalquilenos sustituidos, arileno, arileno sustituido, heteroarileno y heteroarileno sustituido. En ciertos ejemplos, L es C₁₋₁₀ alquilenos o C₁₋₁₀ heteroalquilenos.

En ciertos ejemplos, los aminoácidos no naturales comprenden grupos funcionales tetrazina. La incorporación de grupos funcionales tetrazina en los aminoácidos no naturales permite la reacción selectiva y eficiente de los aminoácidos no naturales con los compuestos que comprenden alquenos tensionados. Los alquenos tensionados útiles incluyen trans-ciclooctenos y norbornenos descritos en la presente. Estas reacciones son selectivas ya que los grupos reactivos - las tetrazinas y los alquenos tensionados - no son reactivos con los grupos funcionales de los aminoácidos de origen natural o con otros grupos reactivos bien conocidos. Además, las reacciones se pueden llevar a cabo en entornos complejos tales como extractos de células, mezclas de reacción de síntesis de proteínas *in vitro* y similares.

La reacción entre la tetrazina y un alqueno tensionado se conoce como "ligadura de tetrazina". Se cree que la tetrazina y el alqueno tensionado reaccionan en una reacción de Diels-Alder de demanda inversa seguida por una reacción retro-Diels-Alder que une la tetrazina al alqueno tensionado. La reacción es específica, con poca o ninguna reactividad cruzada con grupos funcionales que existen en las biomoléculas. La reacción se puede llevar a cabo en condiciones suaves, por ejemplo a temperatura ambiente y sin catalizador.

Los aminoácidos no naturales usados en los métodos y composiciones descritas en la presente descripción tiene al menos una de las siguientes cuatro propiedades: (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 en relación con la reactividad química de los 20 aminoácidos genéticamente codificados comunes (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina), o al menos ortogonal en relación con la reactividad química de los aminoácidos de origen natural presentes en el polipéptido que incluye el aminoácido no natural; (2) los aminoácidos no naturales introducidos son sustancialmente químicamente inertes frente a los 20 aminoácidos genéticamente codificados comunes; (3) el aminoácido no natural puede incorporarse establemente en un polipéptido, preferentemente con la estabilidad acorde con los aminoácidos naturales o bajo condiciones fisiológicas típicas, y aún con mayor preferencia tal incorporación puede ocurrir a través de un sistema *in vivo*; y (4) el aminoácido no natural incluye un grupo funcional oxima o un grupo funcional que puede transformarse en un grupo oxima al reaccionar con un reactivo, preferentemente en condiciones que no destruyen las propiedades biológicas del polipéptido que incluye el aminoácido no natural (a menos, por supuesto, que tal destrucción de las propiedades biológicas sea el propósito de la modificación / transformación), o cuando la transformación puede ocurrir en condiciones acuosas a un pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8, o donde el sitio reactivo en el aminoácido no natural es un sitio electrofílico. Cualquier número de aminoácidos no naturales puede introducirse en el polipéptido. Los aminoácidos no naturales pueden incluir, además, oximas protegidas o enmascaradas o grupos protegidos o enmascarados que pueden transformarse en un grupo oxima después de la desprotección del grupo protegido o desenmascarado del grupo enmascarado. Los aminoácidos no naturales pueden incluir, además, grupos carbonilo o dicarbonilo protegidos o enmascarados, que pueden transformarse en un grupo carbonilo o dicarbonilo después de la desprotección del grupo protegido o desenmascarado del grupo enmascarado y de esta manera estar disponibles para reaccionar con las hidroxilaminas u oximas para formar grupos oxima.

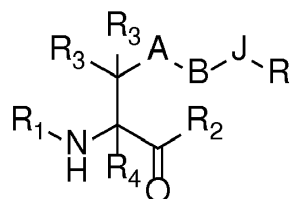
En ejemplos adicionales, los aminoácidos no naturales que se pueden usar en los métodos y composiciones descritos en la presente descripción incluyen, entre otros, aminoácidos que comprenden un reticulante fotoactivable, aminoácidos marcados por espín, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos de unión a metales ácidos, aminoácidos que contienen metales, aminoácidos radioactivos, aminoácidos con nuevos grupos funcionales, aminoácidos que interaccionan de forma covalente o no covalente con otras moléculas, aminoácidos fotoestabilizados y/o fotoisomerizables, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de la biotina, aminoácidos glucosilados tales como una serina sustituida con azúcar, otros aminoácidos modificados con carbohidrato, aminoácidos que contienen ceto, aminoácidos que contienen aldehído, aminoácidos que comprenden polietilenglicol u otros poliéteres, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, aminoácidos químicamente escindibles y/o fotoescindibles, aminoácidos con cadenas laterales largas en comparación con los aminoácidos naturales, que incluyen pero no se limitan a poliéteres o hidrocarburos de cadena larga, que incluyen, pero no se limitan a, más de aproximadamente 5 o más de aproximadamente 10 carbonos, aminoácidos que contienen azúcar unida al carbono, aminoácidos de actividad redox, aminoácidos que contienen amino tioácido y aminoácidos que comprenden una o más fracciones tóxicas.

En algunos ejemplos, los aminoácidos no naturales comprenden una fracción sacárido. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen N-acetil-L-glucosaminil-L-serina, N-acetil-L-galactosaminil-L-serina, N-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, N-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y O-mannosaminil-L-serina. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen, además, ejemplos donde el enlace O o N de origen natural entre el aminoácido y el sacárido se reemplaza por un enlace covalente que no se encuentra comúnmente en la naturaleza, que incluye pero no se limita a, un alqueno, una oxima, un tioéter, una amida y similares. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen, además, sacáridos que no se encuentran comúnmente en las proteínas de origen natural tales como 2-desoxi-glucosa, 2-desoxigalactosa y similares.

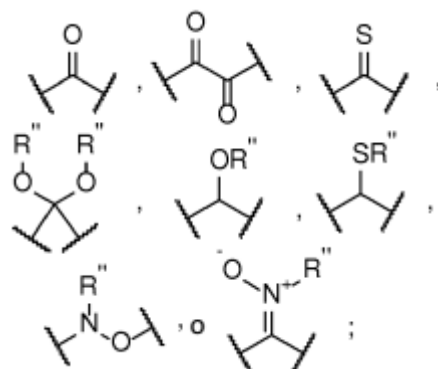
Las fracciones químicas incorporadas en los anticuerpos a través de la incorporación de aminoácidos no naturales ofrecen una variedad de ventajas y manipulaciones de polipéptidos. Por ejemplo, la reactividad única de un grupo funcional carbonilo o dicarbonilo (que incluye un grupo funcional ceto o aldehído) permite la modificación selectiva de anticuerpos con cualquiera de varios reactivos que contienen hidrazina o hidroxilamina *in vivo* e *in vitro*. Un aminoácido no natural de átomo pesado, por ejemplo, puede ser útil para la fase de los datos de la estructura por rayos X. La introducción sitio-específica de los átomos pesados usando aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad al elegir las posiciones para los átomos pesados. Los aminoácidos fotorreactivos no naturales (que incluyen pero no se limitan a, aminoácidos con cadenas laterales de benzofenona y arilazidas (que incluyen, pero no se limitan a, fenilazida)), por ejemplo, permiten una fotorreticulación eficaz *in vivo* e *in vitro* de polipéptidos. Ejemplos de aminoácidos fotorreactivos no naturales incluyen, pero no se limitan a, p-azido-fenilalanina y p-benzoil-fenilalanina. Los anticuerpos con aminoácidos fotorreactivos no naturales pueden reticularse después a voluntad por excitación del grupo fotorreactivo, lo que proporciona un control temporal. En un ejemplo no limitante, el grupo metilo de un amino no natural se puede sustituir con un grupo marcado isotópicamente, que incluye, pero no se limita a, metilo, como una sonda de estructura y dinámica locales, que incluye pero no se limita a, con el uso de resonancia magnética nuclear y espectroscopia vibratoria.

Los aminoácidos con un grupo reactivo electrofílico permiten una variedad de reacciones para enlazar moléculas a través de diversas reacciones químicas, que incluyen, pero no se limitan a, reacciones de adición nucleofílicas. Tales grupos electrofílicos reactivos incluyen un grupo carbonilo o dicarbonilo (que incluye un grupo ceto o aldehído), un grupo similar a un carbonilo o similar al dicarbonilo (con reactividad similar al grupo carbonilo o dicarbonilo y es estructuralmente similar a un grupo carbonilo o dicarbonilo), un grupo carbonilo enmascarado o dicarbonilo enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo carbonilo o dicarbonilo), o un grupo carbonilo protegido o dicarbonilo protegido (que

tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo o dicarbonilo tras la desprotección). Tales aminoácidos incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (I):



5 en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; B es
 10 opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1,2, o
 15 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_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')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido; J es



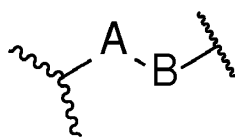
20 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; cada R'' es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, o un grupo protector, o cuando más de un grupo R'' está presente, dos R'' opcionalmente forman un heterocicloalquilo; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; 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-J-R juntos forman un heterocicloalquilo o cicloalquilo bicíclico o tricíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, que incluye un grupo dicarbonilo, grupo carbonilo protegido, que incluye un grupo dicarbonilo protegido, o grupo carbonilo enmascarado, que incluye un grupo dicarbonilo enmascarado; o el grupo
 25 -J-R junto forma un heterocicloalquilo o cicloalquilo monocíclico o bicíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, que incluye un grupo dicarbonilo, grupo carbonilo protegido, que incluye un grupo dicarbonilo protegido, o grupo carbonilo enmascarado, que incluye un grupo dicarbonilo enmascarado; con la condición de que cuando A es fenileno y cada R₃ es H, B está presente; y que cuando A es -(CH₂)₄- y cada R₃ es H, B no es -NHC(O)(CH₂CH₂)-; y que cuando A y B están ausentes y cada R₃ es H, R no es metilo. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

30 En ciertos ejemplos, los compuestos de la Fórmula (I) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes bajo condiciones ligeramente ácidas. En ciertos ejemplos, los compuestos de la Fórmula (I) son estables durante al menos 2
 35 semanas bajo condiciones ligeramente ácidas. En ciertos ejemplos, los compuestos de la Fórmula (I) son estables durante al menos 5 días bajo condiciones ligeramente ácidas. En ciertos ejemplos, tales condiciones ácidas son pH 2 a 8.

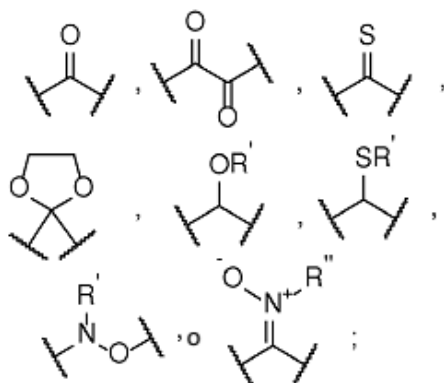
40 En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I), B es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(R')=N-N(R')-, -N(R')CO-, -C(O)-, -C(R')=N-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)(alquileno o alquileno sustituido)-, o -S(O)₂(alquileno o alquileno sustituido)-. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I), 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 ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I), R es C₁-6 alquilo o cicloalquilo. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I) R es -CH₃, -CH(CH₃)₂, o ciclopropilo. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I), R₁ es H, terc-butiloxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), N-acetilo, tetrafluoroacetilo (TFA), o benciloxicarbonilo (Cbz). En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I), R₁ es una resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I), R₂ es OH, O-metilo, O-etilo, o O-t-butilo. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I), R₂ es una resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I), R₂ es un polinucleótido. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I), R₂ es ácido ribonucleico (ARN). En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I), R₂ es ARNt. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I), el ARNt reconoce específicamente un codón selector. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I) el codón selector se selecciona del grupo que consiste en un codón ámbar, un codón ocre, un codón ópalo, un codón único, un codón raro, un codón no natural, un codón de cinco bases y un codón de cuatro bases. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I), R₂ es un ARNt supresor.

En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (I),



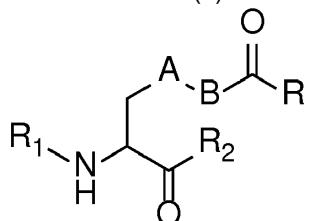
se selecciona del grupo que consiste en: (i) A es alquileo inferior sustituido, C₄-arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo, o aralquileo sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador divalente seleccionado 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')=N-N(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 es alquileo inferior sustituido, 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)₂N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-; (iii) 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, 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')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-; y (iv) A es fenileno; 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)₂N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-; J es



cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido; R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo

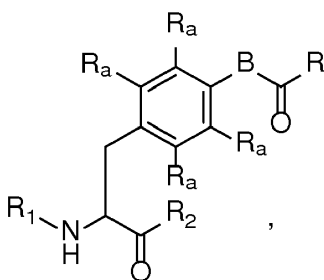
protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R_2 es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y cada R_3 y R_4 es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido; y R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

5 Además, se incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (II):



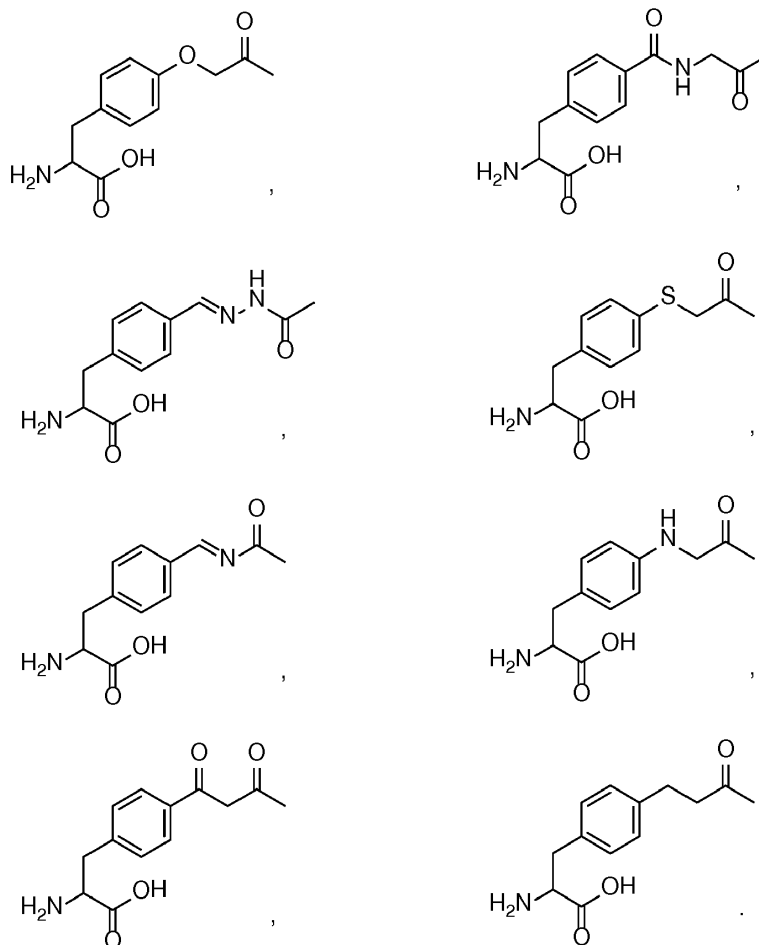
10 en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; B es
 15 opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_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; R_1 es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R_2 es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido. En ciertos ejemplos, cuando A es fenileno, B está presente; y cuando A es -(CH₂)₄-, B no es -NHC(O)(CH₂CH₂)-; y cuando A y B están ausentes, R no es metilo. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

25 Además, se incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (III):



35 en donde: B es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_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; R_1 es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R_2 es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; cada R_a es independientemente seleccionado 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 estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:

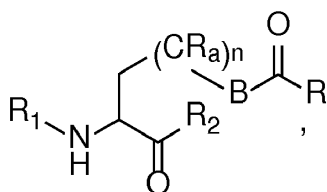


5

y

10 Tales aminoácidos no naturales pueden ser opcionalmente un grupo amino protegido, carboxilo protegido y/o estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado postraduccionalmente.

15 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (IV):

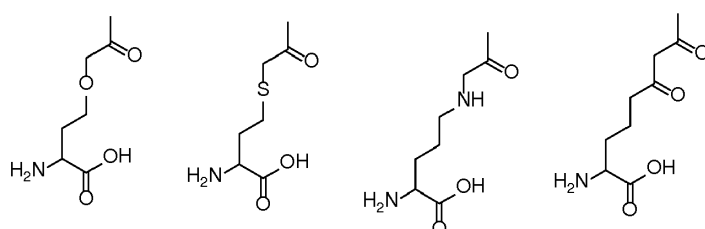
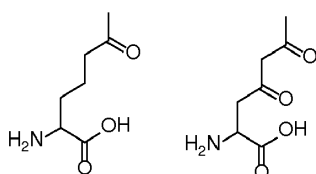
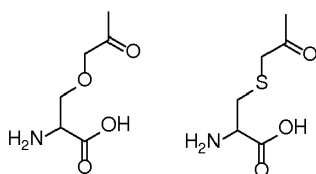


20 en donde $-\text{NS}(\text{O})_2^-$, $-\text{OS}(\text{O})_2^-$, opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, $-\text{O}-$, $-\text{O}-$ (alquileno o alquileno sustituido)-, $-\text{S}-$, $-\text{S}-$ (alquileno o alquileno sustituido)-, $-\text{S}(\text{O})_k-$ donde k es 1, 2, o 3, $-\text{S}(\text{O})_k$ (alquileno o alquileno sustituido)-, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})-$ (alquileno o alquileno sustituido)-, $-\text{C}(\text{S})-$, $-\text{C}(\text{S})-$ (alquileno o alquileno sustituido)-, $-\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{NR}'$ (alquileno o alquileno sustituido)-, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{CON}(\text{R}')-$ (alquileno o alquileno sustituido)-, $-\text{CSN}(\text{R}')-$, $-\text{CSN}(\text{R}')-$ (alquileno o alquileno sustituido)-, $-\text{N}(\text{R}')\text{CO}-$ (alquileno o alquileno sustituido)-, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})_k\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{S}(\text{O})_k\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')-\text{N}=\text{C}(\text{R}')=\text{N}-$, $-\text{C}(\text{R}')=\text{N}-\text{N}=\text{C}(\text{R}')_2-\text{N}=\text{N}-$, y $-\text{C}(\text{R}')_2-\text{N}(\text{R}')-\text{N}(\text{R}')-$, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; R_1 es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R_2 es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; cada R_a es independientemente seleccionado del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, $-\text{N}(\text{R}')_2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2-$, $-\text{OR}'$, y $-\text{S}(\text{O})_k\text{R}'$, donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido; y n es 0 a 8. En ciertos ejemplos, cuando A es $-(\text{CH}_2)_4-$, B no es $-\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_2)-$. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

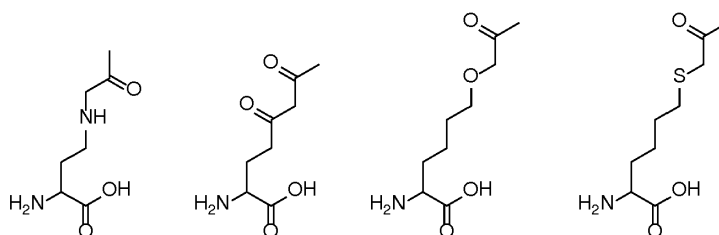
30

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:

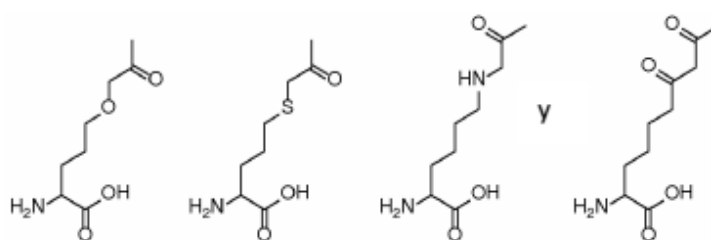
5



10



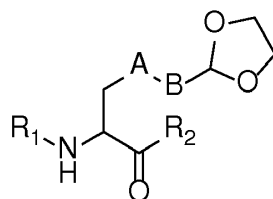
15



en donde tales compuestos son opcionalmente amino protegido, opcionalmente carboxilo protegido, opcionalmente amino protegido y carboxilo protegido, o una sal de estos, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado postraduccionalmente.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (VIII):

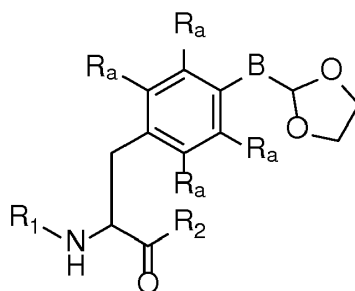
20



en donde, A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno

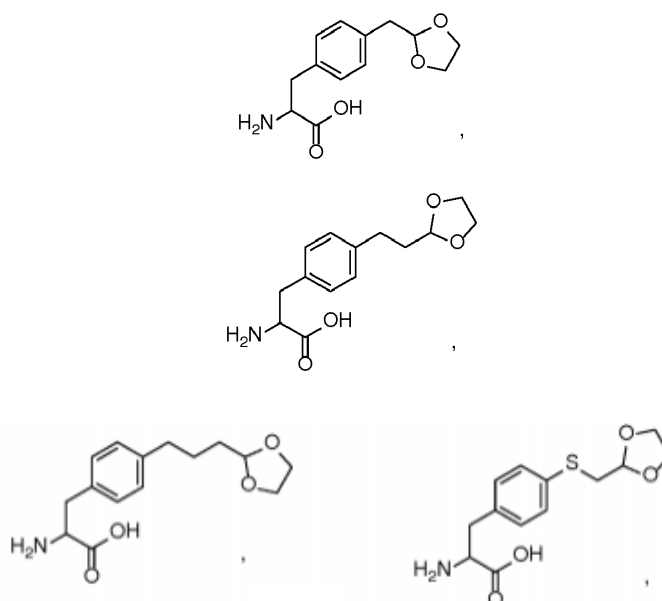
inferior sustituido, alquencileno inferior, alquencileno inferior sustituido, heteroalquencileno inferior, heteroalquencileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -S-, -S-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1,2, o 3, -S(O)_k(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquencileno o alquencileno 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; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

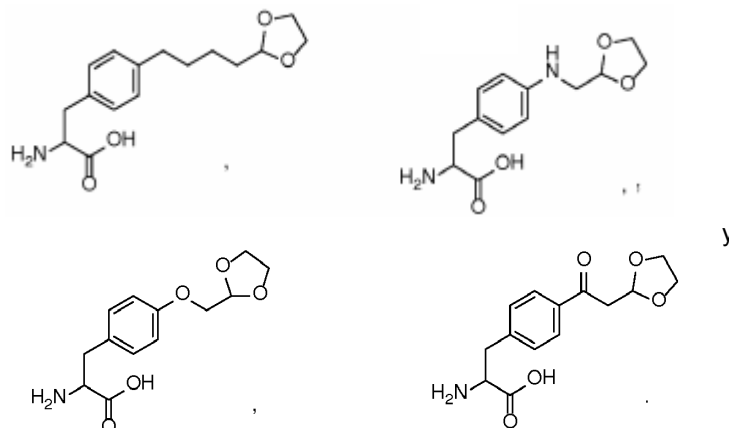
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (IX):



en donde, B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquencileno inferior, alquencileno inferior sustituido, alquencileno inferior sustituido, heteroalquencileno inferior, heteroalquencileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -S-, -S-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -CSN(R')-(alquencileno o alquencileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquencileno o alquencileno 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 amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; en donde cada Ra es independientemente seleccionado 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 estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:

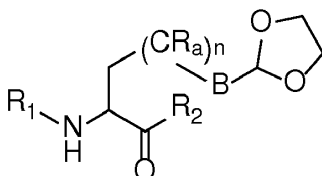




5

en donde tales compuestos son opcionalmente amino protegidos, opcionalmente carboxilo protegidos, opcionalmente amino protegidos y carboxilo protegidos, o una sal de estos, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

10 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (X):

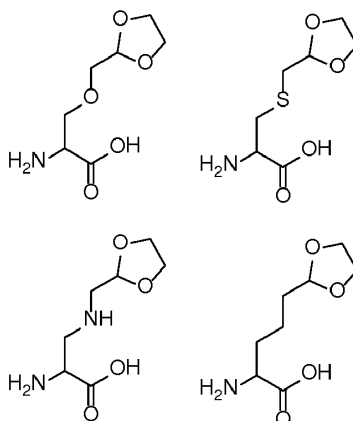


15

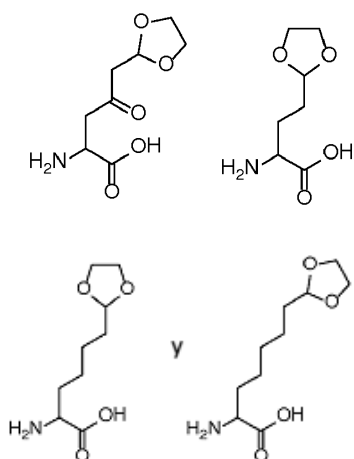
en donde, B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -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)-, -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 protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; cada R_a es independientemente seleccionado 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. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

20

30 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:

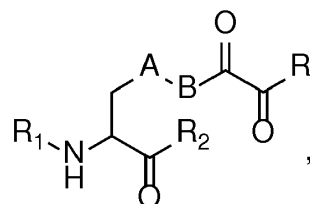


35



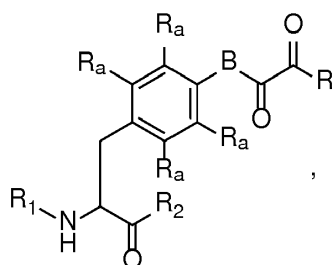
5 en donde tales compuestos están opcionalmente amino protegidos, opcionalmente carboxilo protegidos, opcionalmente amino protegidos y carboxilo protegidos, o una sal de estos, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

10 Además de las estructuras de monocarbonilo, los aminoácidos no naturales descritos en la presente descripción pueden incluir grupos tales como dicarbonilo, similar al dicarbonilo, dicarbonilo enmascarado y grupo dicarbonilo protegidos. Por ejemplo, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (V):



15 en donde, A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; B es
 20 opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1,2, o
 25 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_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 amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar
 30 incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

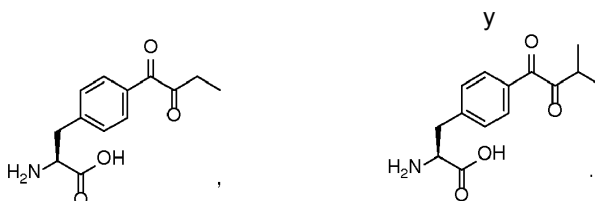
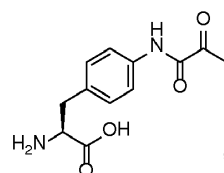
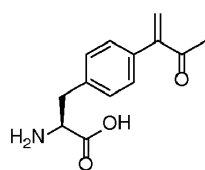
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (VI):



35 en donde, B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno

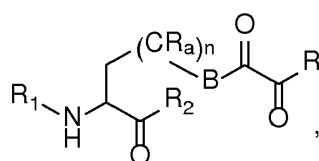
inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -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 protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; en donde cada R_a es independientemente seleccionado 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 estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



en donde tales compuestos están opcionalmente amino protegidos y carboxilo protegidos, o una sal de estos. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

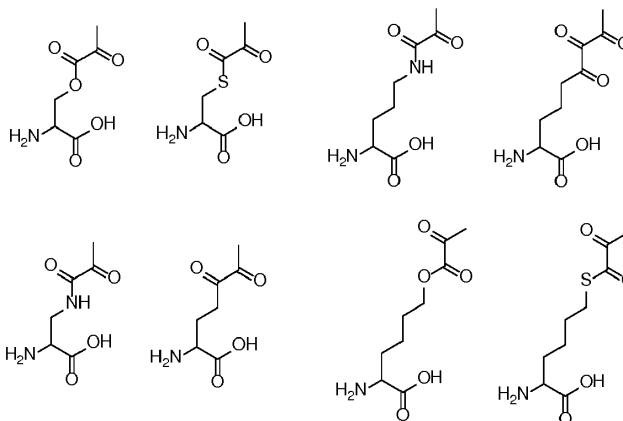
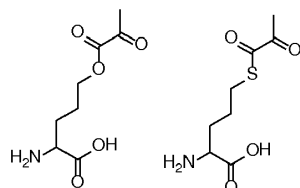
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (VII):



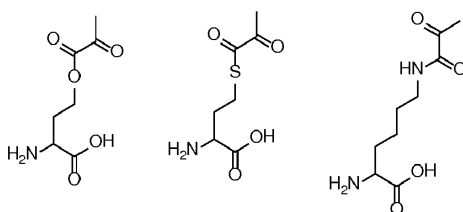
en donde, B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -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)-, -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 protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; cada R_a es independientemente seleccionado 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. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:

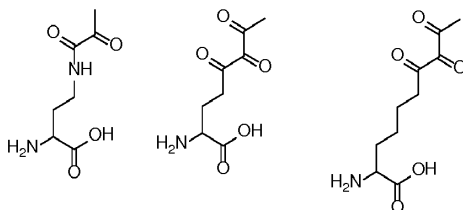
5



10



y

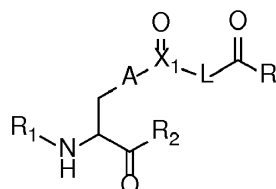


15

en donde tales compuestos están opcionalmente amino protegidos y carboxilo protegidos, o una sal de estos, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado postraduccionalmente.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXX):

20

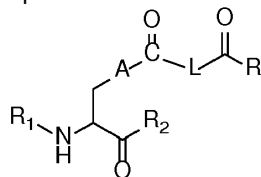


25

en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; X₁ es C, S, o S(O); y L es alquileno, alquileno sustituido, N(R')(alquileno) o N(R')(alquileno sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de

una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXX-A):



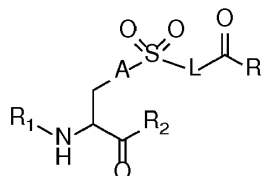
5

en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, cicloalquilenos inferior, cicloalquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, alquilenos, heteroalquilenos inferior, heteroalquilenos sustituido, heterocicloalquilenos inferior, heterocicloalquilenos inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquilenos, o aralquilenos sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; L es alquilenos, alquilenos sustituido, N(R')(alquilenos) o N(R')(alquilenos sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

10

15

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXX-B):



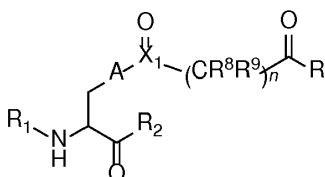
20

en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, cicloalquilenos inferior, cicloalquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, alquilenos, heteroalquilenos inferior, heteroalquilenos sustituido, heterocicloalquilenos inferior, heterocicloalquilenos inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquilenos, o aralquilenos sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; L es alquilenos, alquilenos sustituido, N(R')(alquilenos) o N(R')(alquilenos sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

25

30

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXXI):



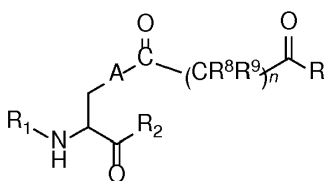
35

en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, cicloalquilenos inferior, cicloalquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, alquilenos, heteroalquilenos inferior, heteroalquilenos sustituido, heterocicloalquilenos inferior, heterocicloalquilenos inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquilenos, o aralquilenos sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; X₁ es C, S, o S(O); y n es 0, 1, 2, 3, 4, o 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ es independientemente seleccionado del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ juntos pueden formar =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes juntos pueden formar un cicloalquilo. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

40

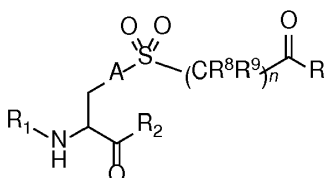
45

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXXI-A):



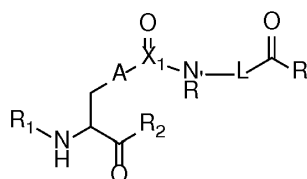
5 en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; n es 0, 1, 2, 3, 4, o 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ es independientemente seleccionado del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ juntos pueden formar =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes juntos pueden formar un cicloalquilo. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

15 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXXI-B):



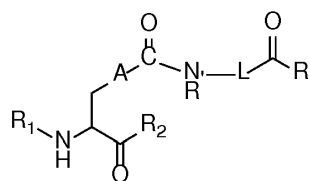
20 en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; n es 0, 1, 2, 3, 4, o 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ es independientemente seleccionado del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ juntos pueden formar =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes juntos pueden formar un cicloalquilo. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

30 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXXII):



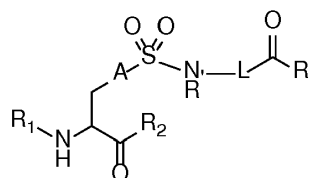
35 en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; X₁ es C, S, o S(O); y L es alquileno, alquileno sustituido, N(R')(alquileno) o N(R')(alquileno sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

45 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXXII-A):



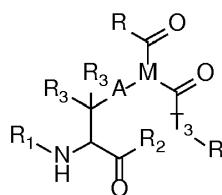
5 en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; L es alquileno, alquileno sustituido, N(R')(alquileno) o N(R')(alquileno sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

15 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXXII-B):

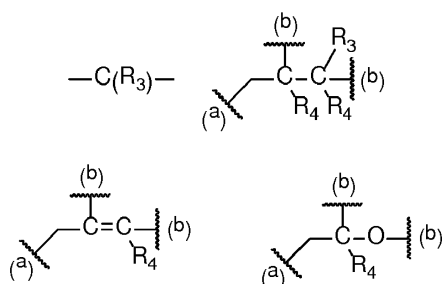


20 en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; L es alquileno, alquileno sustituido, N(R')(alquileno) o N(R')(alquileno sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

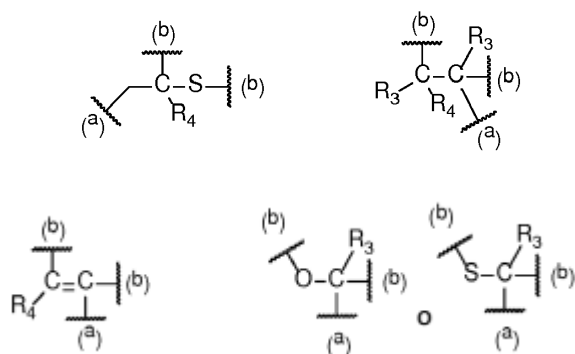
30 Además, se incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXXX):



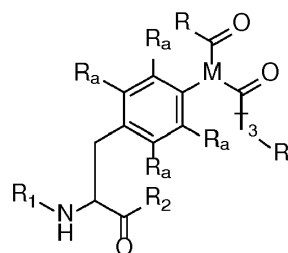
35 en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno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



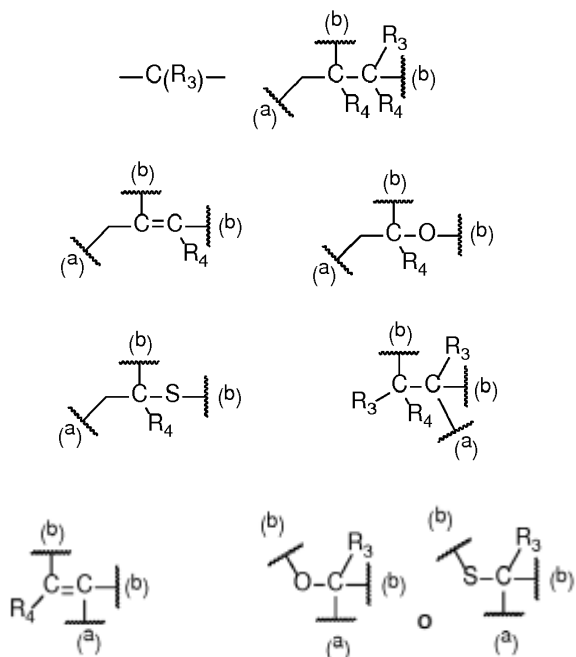
40



- 5 donde (a) indica el enlace al grupo A y (b) indica el enlace a los grupos carbonilo respectivos, R₃ y R₄ son independientemente seleccionados de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido, o R₃ y R₄ o dos R₃ grupos o dos R₄ grupos 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 protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.
- 10
- 15 Además, se incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXXXI):



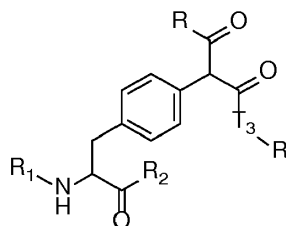
- 20 en donde:



- 25
- 30 donde (a) indica el enlace al grupo A y (b) indica el enlace a los grupos carbonilo respectivos, R₃ y R₄ son independientemente seleccionados 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,

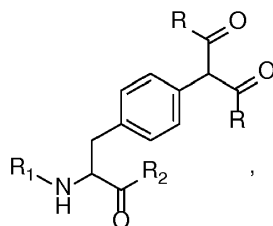
5 halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; T_3 es un enlace, C(R)(R), O, o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; R_1 es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R_2 es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; cada R_a es independientemente seleccionado 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 estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

10 Además, se incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXXXII):



15 en donde: R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; y T_3 es O, o S. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

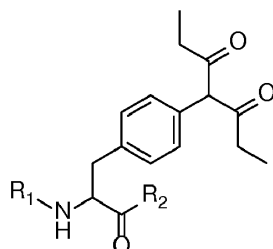
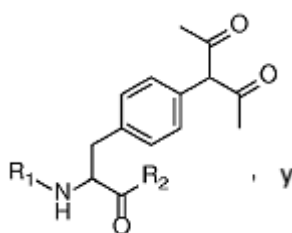
Además, se incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XXXXIII):



20

en donde: R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

25 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen estructuras de la Fórmula (XXXXIII):

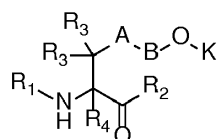


30 Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

35 Los aminoácidos no naturales que contienen un grupo hidroxilamina (también llamado aminooxi) permiten la reacción con una variedad de grupos electrofílicos para formar conjugados (que incluyen pero no se limitan a, con PEG u otros polímeros solubles en agua). Al igual que las hidrazinas, las hidrazidas y semicarbazidas, la nucleofilicidad mejorada del

grupo aminooxi le permite reaccionar de manera eficiente y selectiva con una variedad de moléculas que contienen grupos carbonilo o dicarbonilo, que incluyen, pero no se limitan a, cetonas, aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Ver, por ejemplo, Shao, J. y Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995); H. Hang y C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34(9): 727-736 (2001). Mientras que el resultado de la reacción con un grupo hidrazina es la hidrazona correspondiente, sin embargo, una oxima resulta generalmente de la reacción de un grupo aminooxilo con un grupo que contiene carbonilo o dicarbonilo tal como, a manera de ejemplo, cetonas, aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar

Así, en ciertos ejemplos descritos en la presente descripción se encuentran los aminoácidos no naturales con cadenas laterales que comprenden un grupo hidroxilamina, un grupo similar a hidroxilamina (que tiene reactividad similar a un grupo hidroxilamina y es estructuralmente similar a un grupo hidroxilamina), un grupo hidroxilamina enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo hidroxilamina), o un grupo hidroxilamina protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo hidroxilamina tras la desprotección). Tales aminoácidos incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XIV):



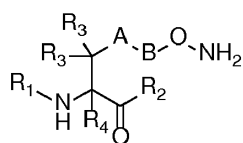
en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_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 -NR₆R₇ o -N=CR₆R₇; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos R₃ grupos opcionalmente forman un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; cada uno de R₆ y R₇ es independientemente seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialquileno, óxido de polialquileno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, y aralquilo sustituido, -C(O)R'', -C(O)₂R'', -C(O)N(R'')₂, en donde cada R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, o aralquilo sustituido; o R₆ o R₇ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulador; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un DNA; un RNA; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene metales; una fracción radioactiva; un grupo funcional novedoso; un grupo que interactúa de manera covalente o no con otras moléculas; una fracción fotoestabilizada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo que puede escindirse químicamente; un grupo que puede fotoescindirse; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente redox activo; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrón denso; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de estos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno, alquileno sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_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. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), A es fenileno o fenileno sustituido. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), B es -(alquileno o alquileno sustituido)-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, o -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), B es -O(CH₂)₂-, -S(CH₂)₂-, -NH(CH₂)₂-, -CO(CH₂)₂-, o -(CH₂)_n- donde n es 1 a 4. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), R₁ es H, terc-butiloxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), N-acetilo, tetrafluoroacetilo (TFA), o benciloxicarbonilo (Cbz). En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), R₁ es una resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), en donde R₂ es OH, O-metilo, O-etilo, o O-t-butilo. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), R₂ es una resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), R₂ es un polinucleótido. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), R₂ es ácido ribonucleico (ARN). En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), R₂ es ARNt. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), el ARNt reconoce específicamente un codón seleccionado del grupo que consiste en un codón ámbar, codón ocre, codón ópalo, un codón único, un codón raro, un codón no natural, un codón de cinco bases y un codón de cuatro bases. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), R₂ es un ARNt supresor. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), cada uno de R₆ y R₇ es independientemente seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialquileno, óxido de polialquileno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, y aralquilo sustituido. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), cada uno de R₆ y R₇ es independientemente seleccionado del grupo que consiste en H, metilo, fenilo, y -(alquileno o alquileno sustituido)-O-(hidrógeno, alquilo, o sustituido alquil)]_x, en donde X es de 1-50. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), k es -NR₆R₇.

En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), X es un agente biológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en un péptido, proteína, enzima, anticuerpo, fármaco, colorante, lípido, nucleósidos, oligonucleótido, célula, virus, liposoma, micropartícula, y micela. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), X es un fármaco seleccionado del grupo que consiste en un antibiótico, fungicida, agente antiviral, agente antiinflamatorio, agente antitumoral, agente cardiovascular, agente ansiolítico, hormona, factor de crecimiento y agente esteroideo. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), X es una enzima seleccionada del grupo que consiste en peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa y glucosa oxidasa. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XIV), X es un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en uno fluorescente, fosforescente, quimioluminiscente, quelante, electrón denso, magnético, intercalado, radioactivo, cromóforo y fracción de transferencia de energía.

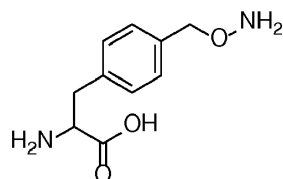
En ciertos ejemplos, los compuestos de la Fórmula (XIV) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes bajo condiciones ligeramente ácidas. En ciertos ejemplos, los compuestos de la Fórmula (XIV) son estables durante al menos 2 semanas bajo condiciones ligeramente ácidas. En ciertos ejemplos, los compuestos de la Fórmula (XIV) son estables durante al menos 5 días bajo condiciones ligeramente ácidas. En ciertos ejemplos, tales condiciones ácidas son pH 2 a 8.

Tales aminoácidos incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XV):



en donde A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_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; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o grupos R₃ y R₄ o dos R₃ opcionalmente forman un cicloalquilo o un heterocicloalquilo. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

Un aminoácido representativo no limitante tiene la siguiente estructura:



5

Tal aminoácido no natural puede estar en forma de una sal, o pueden estar incorporado en un aminoácido no natural, polipéptido, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

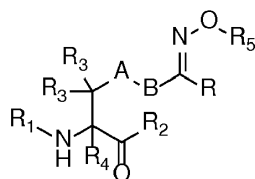
10

Los aminoácidos no naturales que contienen un grupo oxima permiten la reacción con una variedad de reactivos que contienen ciertos grupos carbonilo o dicarbonilo reactivos (que incluyen pero no se limitan a, cetonas, aldehídos, u otros grupos con similar reactividad) para formar nuevos aminoácidos no naturales que comprenden un nuevo grupo oxima. Tal reacción de intercambio de oximas permite la funcionalización adicional de polipéptidos de aminoácidos no naturales. Además, los aminoácidos no naturales originales que contienen un grupo oxima pueden ser útiles por derecho propio siempre que el enlace oxima sea estable en las condiciones necesarias para incorporar el aminoácido en un polipéptido (por ejemplo, métodos químicos sintéticos descritos en la presente descripción).

15

Así, en ciertos ejemplos descritos en la presente descripción se encuentran los aminoácidos no naturales con cadenas laterales que comprende un grupo oxima, un grupo similar a oxima (que tiene reactividad similar a un grupo oxima y es estructuralmente similar a un grupo oxima), un grupo oxima enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo oxima), o un grupo oxima protegido (que tiene reactividad similar a un grupo oxima después de la desprotección). Tales aminoácidos incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XI):

20



25

en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno, o aralquileno sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_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 amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos R₃ opcionalmente forman un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; R₅ es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialquileno, óxido de polialquileno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, -(alquileno o alquileno sustituido)-ON(R'')₂, -(alquileno o alquileno sustituido)-C(O)SR'', -(alquileno o alquileno sustituido)-S-S-(arilo o arilo sustituido), -C(O)R'', -C(O)₂R'', o -C(O)N(R'')₂, en donde cada R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, o aralquilo sustituido; o R₅ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulador; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un DNA; un RNA; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene metales; una fracción radioactiva; un grupo funcional novedoso; un grupo que interactúa de manera covalente o no con otras moléculas; una fracción fotoestabilizada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo que puede escindir

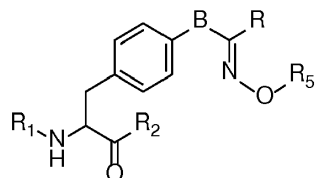
55

químicamente; un grupo que puede fotoescindirarse; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente redox activo; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrón denso; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de estos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno, alquileno sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -(alquileno o alquileno sustituido)-O-N=CR', -(alquileno o alquileno sustituido)-C(O)NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -(alquileno o alquileno sustituido)-S(O)_k-(alquileno o alquileno sustituido)-S-, -(alquileno o alquileno sustituido)-S-S-, -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; con la condición de que cuando A y B están ausentes, R no es metilo. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), B es -O-(alquileno o alquileno sustituido)-. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), B es -O(CH₂)-. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R es C₁₋₄ alquilo. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R es -CH₃. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R₁ es H, terc-butiloxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), N-acetilo, tetrafluoroacetilo (TFA), o benciloxicarbonilo (Cbz). En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R₂ es una resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R₂ es OH, O-metilo, O-etilo, o O-t-butilo. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R₂ es una resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R₂ es un polinucleótido. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R₂ es ácido ribonucleico (ARN). En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R₂ es ARNt. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), el ARNt reconoce específicamente un codón selector. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), el codón selector se selecciona del grupo que consiste en un codón ámbar, un codón ocre, un codón ópalo, un codón único, un codón raro, un codón no natural, un codón de cinco bases y un codón de cuatro bases. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R₂ es un ARNt supresor. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R₅ es alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialquileno, óxido de polialquileno sustituido, o -C(O)₂R". En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R₅ es -(alquileno o alquileno sustituido)-O-(hidrógeno, alquilo, o alquilo sustituido)_x, en donde X es de 1-50. En ciertos ejemplos de los compuestos de la Fórmula (XI), R₅ es -(CH₂CH₂)-O-CH₃ o -COOH.

En ciertos ejemplos, los compuestos de la Fórmula (XI) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes bajo condiciones ligeramente ácidas. En ciertos ejemplos, los compuestos de la Fórmula (XI) son estables durante al menos 2 semanas bajo condiciones ligeramente ácidas. En ciertos ejemplos, compuesto de la Fórmula (XI) son estables durante al menos 5 días bajo condiciones ligeramente ácidas. En ciertos ejemplos, tales condiciones ácidas son pH 2 a 8.

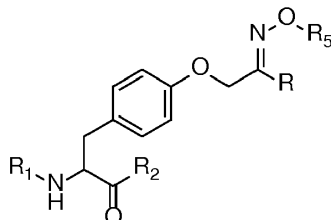
Los aminoácidos de la Fórmula (XI) incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XII):



en donde, B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_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 amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; R₅ es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialquileno, óxido de polialquileno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo

5 sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, -(alquileo o alquileo sustituido)-ON(R'')₂, -(alquileo o alquileo sustituido)-C(O)SR'', -(alquileo o alquileo sustituido)-S-S-(arilo o arilo sustituido), -C(O)R'', -C(O)₂R'', o -C(O)N(R'')₂, en donde cada R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueniilo, alqueniilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, o aralquilo sustituido; o R₅ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulador; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un DNA; un RNA; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene metales; una fracción radioactiva; un grupo funcional novedoso; un grupo que interactúa de manera covalente o no con otras moléculas; una fracción fotoestabilizada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo que puede escindirse químicamente; un grupo que puede fotoescindirse; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente redox activo; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrón denso; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de estos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alqueniilo, alqueniilo 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-, - (alquileo o alquileo sustituido)-O-N=CR'-, -(alquileo o alquileo sustituido)-C(O)NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -(alquileo o alquileo sustituido)-S(O)_k-(alquileo o alquileo sustituido)-S-, -(alquileo o alquileo sustituido)-S-S-, -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. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados posttraduccionalmente.

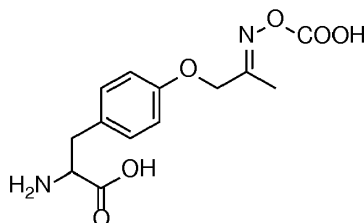
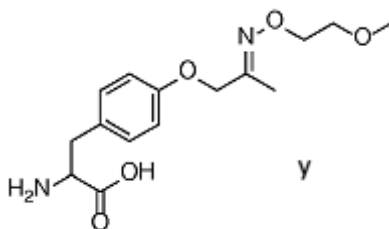
30 Tales aminoácidos incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XIII):



35 en donde, R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; R₅ es H, alquilo, alquilo sustituido, alqueniilo, alqueniilo sustituido, alquiniilo, alquiniilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, -(alquileo o alquileo sustituido)-ON(R'')₂, -(alquileo o alquileo sustituido)-C(O)SR'', -(alquileo o alquileo sustituido)-S-S-(arilo o arilo sustituido), -C(O)R'', -C(O)₂R'', o -C(O)N(R'')₂, en donde cada R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueniilo, alqueniilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, o aralquilo sustituido; o R₅ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulador; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un DNA; un RNA; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene metales; una fracción radioactiva; un grupo funcional novedoso; un grupo que interactúa de manera covalente o no con otras moléculas; una fracción fotoestabilizada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo que puede escindirse químicamente; un grupo que puede fotoescindirse; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente redox activo; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrón denso; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de estos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alqueniilo, alqueniilo 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')-, -

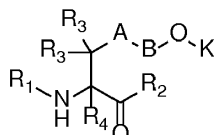
5 NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -(alquileo o alquileo sustituido)-O-N=CR'-, -(alquileo o alquileo sustituido)-C(O)NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -(alquileo o alquileo sustituido)-S(O)_k-(alquileo o alquileo sustituido)-S-, -(alquileo o alquileo sustituido)-S-S-, -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. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

10 Ejemplos no limitantes adicionales de tales aminoácidos incluyen los aminoácidos que tienen las siguientes estructuras:



15 Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

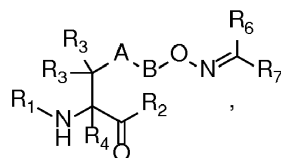
Además, tales aminoácidos incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XIV):



20 en 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, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo, o aralquileo sustituido; B es
 25 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)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)₂-, -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; k es -NR₆R₇ o -N=CR₆R₇; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos R₃ grupos
 35 opcionalmente forman un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; cada uno de R₆ y R₇ es independientemente seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquilenilo, alquilenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, y aralquilo sustituido, -C(O)R'', -C(O)₂R'', -C(O)N(R'')₂, en donde cada R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquilenilo, alquilenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, o aralquilo sustituido; o R₆ o R₇ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulador; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un
 45

polinucleótido; un DNA; un RNA; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene metales; una fracción radioactiva; un grupo funcional novedoso; un grupo que interactúa de manera covalente o no con otras moléculas; una fracción fotoestabilizada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo que puede escindirse químicamente; un grupo que puede fotoescindirse; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente redox activo; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrón denso; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de estos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_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. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

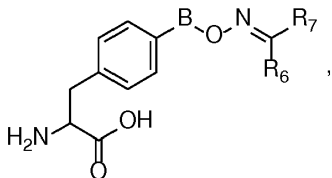
Tales aminoácidos incluyen, además, los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XVI):



en donde: A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo, o aralquileo sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -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; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos R₃ opcionalmente forman un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; cada uno de R₆ y R₇ es independientemente seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, y aralquilo sustituido, -C(O)R", -C(O)₂R", -C(O)N(R")₂, en donde cada R" es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, o aralquilo sustituido; o R₆ o R₇ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulador; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un DNA; un RNA; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene metales; una fracción radioactiva; un grupo funcional novedoso; un grupo que interactúa de manera covalente o no con otras moléculas; una fracción fotoestabilizada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo que puede escindirse químicamente; un grupo que puede fotoescindirse; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente redox activo; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrón denso; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de estos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_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. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

Adicionalmente, tales aminoácidos incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XVII):

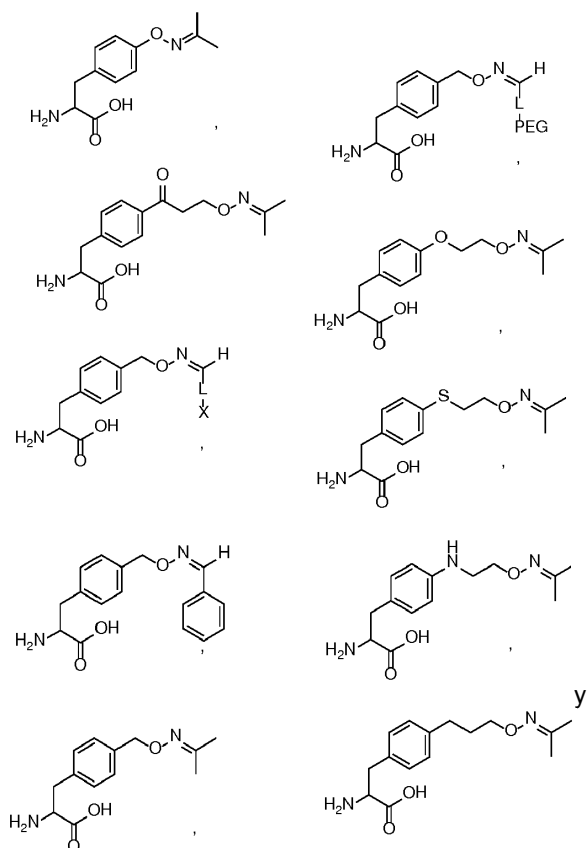


10

en donde: 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)-, -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=, y -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 protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; cada uno de R₆ y R₇ es independientemente seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquilenilo, alquilenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, y aralquilo sustituido, -C(O)R", -C(O)₂R", -C(O)N(R")₂, en donde cada R" es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquilenilo, alquilenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, o aralquilo sustituido; o R₆ o R₇ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulador; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un DNA; un RNA; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene metales; una fracción radioactiva; un grupo funcional novedoso; un grupo que interactúa de manera covalente o no con otras moléculas; una fracción fotoestabilizada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo que puede escindir-se químicamente; un grupo que puede fotoescindir-se; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente redox activo; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrón denso; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de estos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquilenilo, alquilenilo 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.

45

Los ejemplos no limitantes de tales aminoácidos incluyen los aminoácidos que tienen las siguientes estructuras:

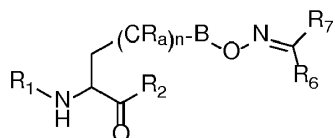


5

Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

10

Adicionalmente, tales aminoácidos incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (XVIII):



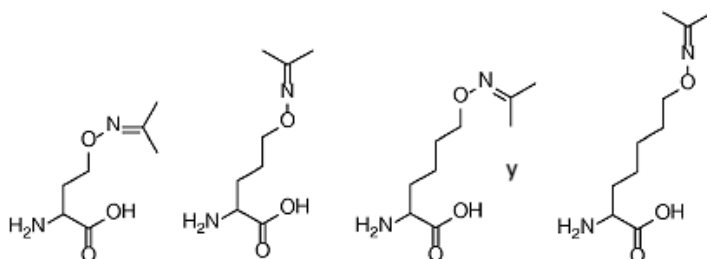
15

en donde: 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)-, -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; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido; cada uno de R₆ y R₇ es independientemente seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, y aralquilo sustituido, -C(O)R", -C(O)₂R", -C(O)N(R")₂, en donde cada R" es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, o aralquilo sustituido; o R₆ o R₇ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulador; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un DNA; un RNA; un polinucleótido antisentido; un sacárido; un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene metales; una fracción radioactiva; un grupo funcional novedoso; un grupo que

35

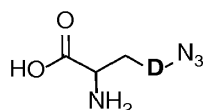
interactúa de manera covalente o no con otras moléculas; una fracción fotoestabilizada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo que puede escindir-se químicamente; un grupo que puede fotoescindir-se; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente redox activo; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrón denso; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de estos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquilenilo, alquilenilo 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; y cada R_a es independientemente seleccionado 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. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

Los ejemplos no limitantes de tales aminoácidos incluyen los aminoácidos que tienen las siguientes estructuras:



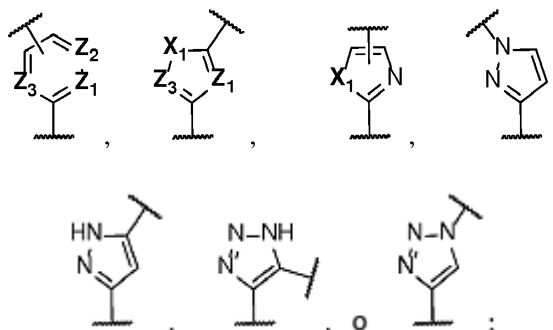
Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con la Fórmula XIX:

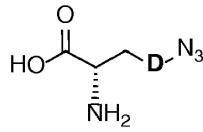


Fórmula XIX;

o una sal de estos, en donde: D es -Ar-W₃- o -W₁-Y₁-C(O)-Y₂-W₂-; Ar es

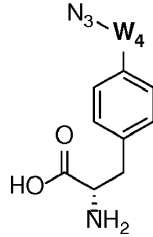


cada uno de W₁, W₂, y W₃ es independientemente un enlace simple o alquileo inferior; cada X₁ es independientemente -NH-, -O-, o -S-; cada Y₁ es independientemente un enlace simple, -NH-, o -O-; cada Y₂ es independientemente un enlace simple, -NH-, -O-, o un pirrolidinileno unido a N o unido a C; y uno de Z₁, Z₂, y Z₃ es -N- y los otros de Z₁, Z₂, y Z₃ son independientemente -CH-. En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural es de acuerdo con la Fórmula XIXa:



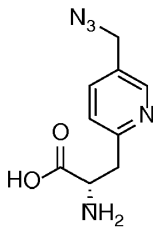
Fórmula XIXa;

5 donde D se define en el contexto de la Fórmula XIX. En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural es de acuerdo con la Fórmula XIXb:

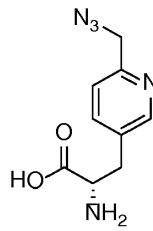


Fórmula XIXb;

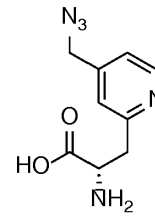
10 o una sal de estos, en donde W₄ es C₁-C₁₀ alquileo. En un ejemplo adicional, W₄ es C₁-C₅ alquileo. En un ejemplo, W₄ es C₁-C₃ alquileo. En un ejemplo, W₄ es C₁ alquileo. En ejemplos particulares, el aminoácido no natural se selecciona del grupo que consiste en:



(1)

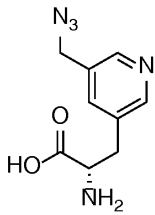


(2)

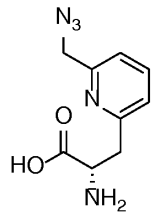


(3)

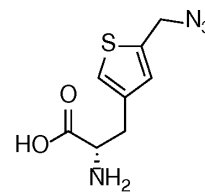
15



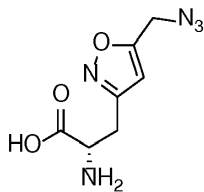
(4)



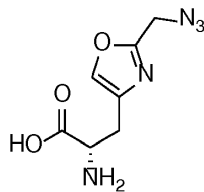
(5)



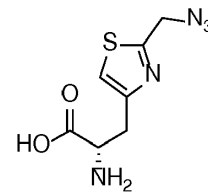
(6)



(7)

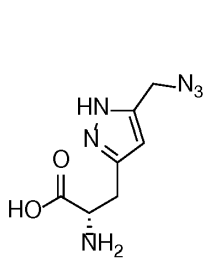


(8)

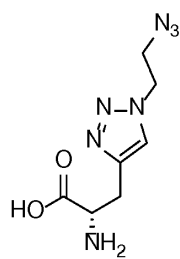


(9)

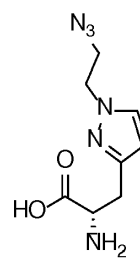
20



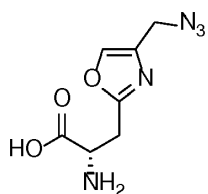
(10)



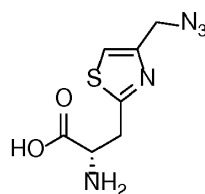
(11)



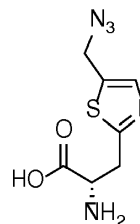
(12)



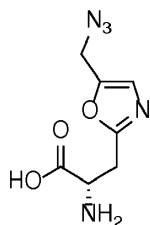
(13)



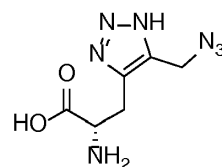
(14)



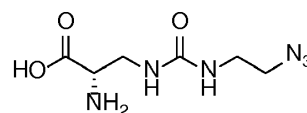
(15)



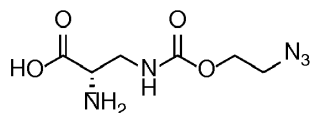
(16)



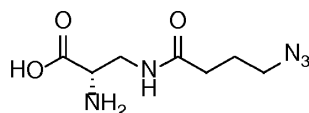
(17)



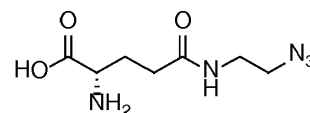
(18)



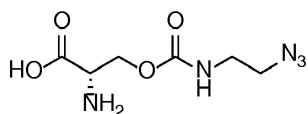
(19)



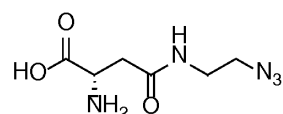
(20)



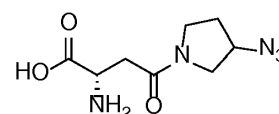
(21)



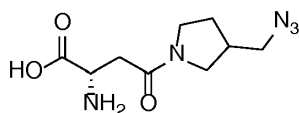
(22)



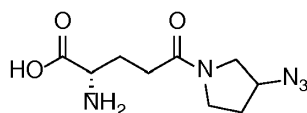
(23)



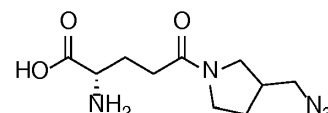
(24)



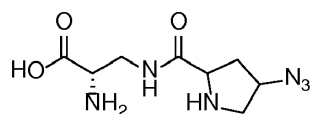
(25)



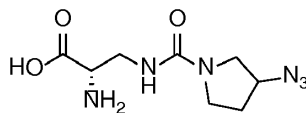
(26)



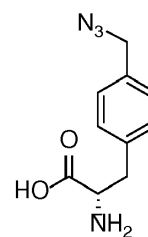
(27)



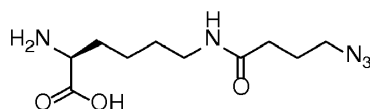
(28)



(29)



(30);



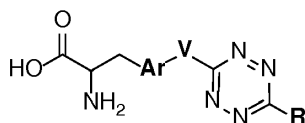
(40);

y

5 o una sal de estos. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido con aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

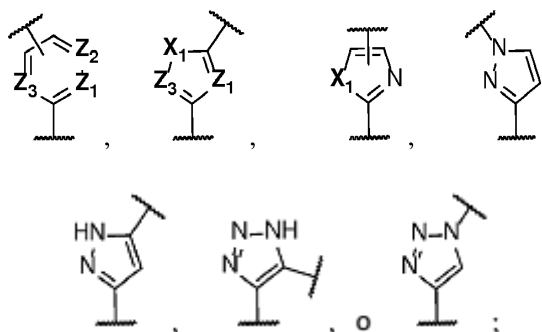
10 Los aminoácidos no naturales que comprenden grupos funcionales azida, tales como los aminoácidos no naturales proporcionados en cualquiera de las Fórmulas XIX, XIXa, XIXb, (1)-(30), y (40) pueden prepararse de acuerdo con los métodos proporcionados en WO 2014/036492 A1.

En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con la Fórmula AI:

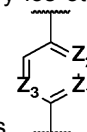


15 Fórmula AI;

20 o una sal de éstos, en donde Ar es:

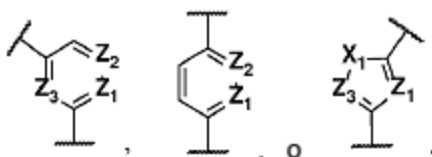


25 V es un enlace simple, alquileo inferior, o -W₁-W₂-; uno de W₁ y W₂ está ausente o es alquileo inferior, y el otro es -NH-, -O-, o -S-; cada X₁ es independientemente -NH-, -O-, o -S-; uno de Z₁, Z₂, y Z₃ es -CH- o -N- y los otros de Z₁,



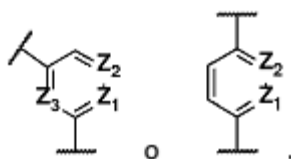
Z₂, y Z₃ son cada independientemente -CH-; y R es alquilo inferior. En ciertos ejemplos, cuando Ar es NH-, entonces uno de Z₁, Z₂, y Z₃ es -N-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-.

30 En ciertos ejemplos, Ar es



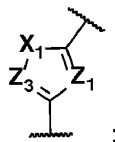
5 y Z_1 , Z_2 , Z_3 y X_1 son como los definidos en el contexto de la Fórmula I. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es $-W_1-W_2-$; uno de W_1 y W_2 está ausente o es $-CH_2-$, y el otro es $-NH-$, $-O-$, o $-S-$. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es un enlace simple, $-NH-$, o $-CH_2NH-$. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, Z_1 es N. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, Z_2 es N. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, Z_3 es N. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, Z_1 es CH, Z_3 es CH y X_1 es S.

10 En ciertos ejemplos, Ar es



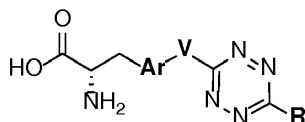
15 y Z_1 , Z_2 , y Z_3 son como los definidos en el contexto de la Fórmula I. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es $-W_1-W_2-$; uno de W_1 y W_2 está ausente o es $-CH_2-$, y el otro es $-NH-$, $-O-$, o $-S-$. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es un enlace simple, $-NH-$, o $-CH_2NH-$. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, Z_1 es N. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, Z_2 es N. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, Z_3 es N.

20 En ciertos ejemplos, Ar es



25 y Z_1 , Z_3 y X_1 son como los definidos en el contexto de la Fórmula I. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es $-W_1-W_2-$; uno de W_1 y W_2 está ausente o es $-CH_2-$, y el otro es $-NH-$, $-O-$, o $-S-$. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es un enlace simple, $-NH-$, o $-CH_2NH-$. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, Z_1 es N. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, Z_3 es N. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, Z_1 es CH, Z_3 es CH y X_1 es S.

30 En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con la Fórmula Ala:

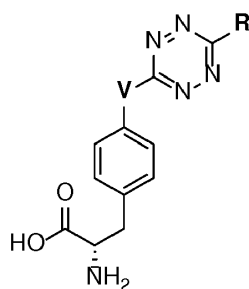


Fórmula Ala;

35 donde Ar, V, y R se definen en el contexto de la Fórmula AI.

En un ejemplo, se proporcionan los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I y Ia en donde V es un enlace simple. En otro ejemplo, se proporcionan los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I y Ia en donde V es $-NH-$. En otro ejemplo, se proporcionan compuestos de cualquiera de las Fórmulas I y Ia en donde V es $-CH_2NH-$.

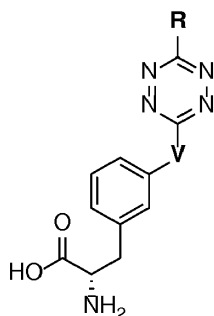
40 En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con la Fórmula AII:



Fórmula AII;

5 o una sal de estos, en donde V y R son como los definidos en la Fórmula AI. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es -W₁-W₂-; uno de W₁ y W₂ está ausente o es -CH₂-, y el otro es -NH-, -O-, o -S-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple o -CH₂NH-; y R es metilo.

En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con la Fórmula AIII:

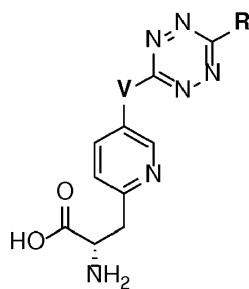


Fórmula AIII;

10

15 o una sal de estos, en donde V y R son como los definidos en la Fórmula AI. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es -W₁-W₂-; uno de W₁ y W₂ está ausente o es -CH₂-, y el otro es -NH-, -O-, o -S-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-; y R es metilo.

En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con la Fórmula AIV:

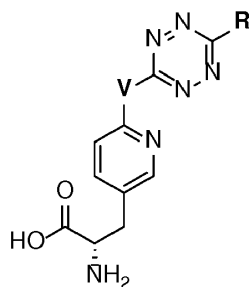


Fórmula AIV;

20

25 o una sal de estos, en donde V y R son como los definidos en la Fórmula AI. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es -W₁-W₂-; uno de W₁ y W₂ está ausente o es -CH₂-, y el otro es -NH-, -O-, o -S-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-; y R es metilo.

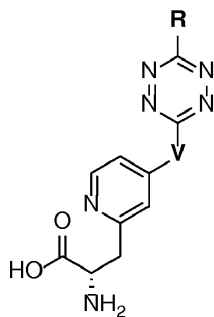
En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con la Fórmula AV:



Fórmula AV;

5 o una sal de estos, en donde V y R son como los definidos en la Fórmula AI. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es -W₁-W₂-; uno de W₁ y W₂ está ausente o es -CH₂-, y el otro es -NH-, -O-, o -S-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-; y R es metilo.

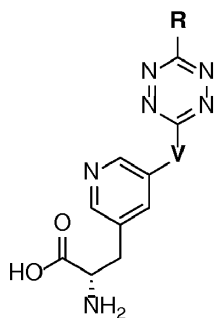
10 En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con la Fórmula AVI:



Fórmula AVI;

15 o una sal de estos, en donde V y R son como los definidos en la Fórmula AI. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es -W₁-W₂-; uno de W₁ y W₂ está ausente o es -CH₂-, y el otro es -NH-, -O-, o -S-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-; y R es metilo.

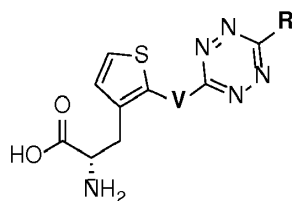
20 En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con la Fórmula AVII:



Fórmula AVII;

25 o una sal de estos, en donde V y R son como los definidos en la Fórmula AI. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es -W₁-W₂-; uno de W₁ y W₂ está ausente o es -CH₂-, y el otro es -NH-, -O-, o -S-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-; y R es metilo.

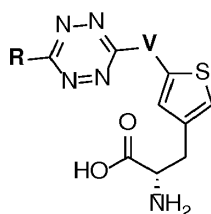
En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con la Fórmula AVIII:



Fórmula AVIII;

5 o una sal de estos, en donde V y R son como los definidos en la Fórmula AI. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es -W₁-W₂-; uno de W₁ y W₂ está ausente o es -CH₂-, y el otro es -NH-, -O-, o -S-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-; y R es metilo.

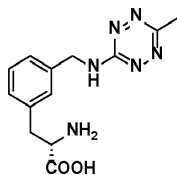
10 En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con la Fórmula AIX:



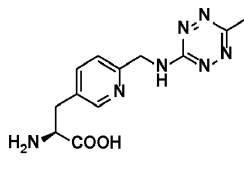
Fórmula AIX;

15 o una sal de estos, en donde V y R son como los definidos en la Fórmula AI. En ciertos ejemplos de acuerdo con este párrafo, V es -W₁-W₂-; uno de W₁ y W₂ está ausente o es -CH₂-, y el otro es -NH-, -O-, o -S-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-. En ciertos ejemplos, V es un enlace simple, -NH-, o -CH₂NH-; y R es metilo.

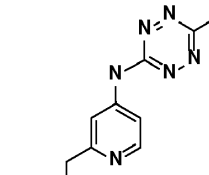
20 En ciertos ejemplos, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con cualquiera de la Fórmulas (A1)-(A10):



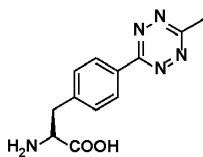
(A1)



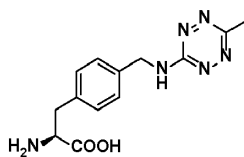
(A2)



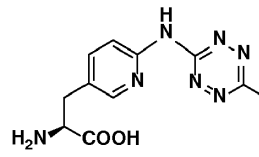
(A3)



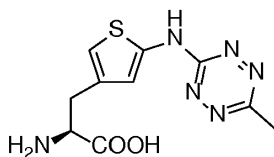
(A4)



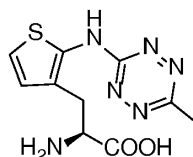
(A5)



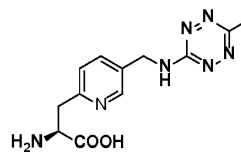
(A6)



(A7)

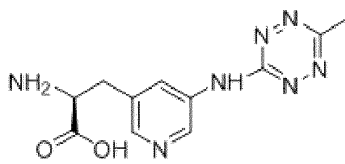


(A8)



(A9)

25



(A10)

o una sal de estos.

5

Los aminoácidos no naturales que comprenden grupos funcionales tetrazina, tales como los aminoácidos no naturales proporcionados en cualquiera de las Fórmulas AI, Ala, AII, AIII, AIV, AV, AVI, AVII, AVIII, AIX, y (A1)-(A10) pueden prepararse de acuerdo con métodos proporcionados en la solicitud de patente provisional titulada "Modified Amino Acids Comprising Tetrazine Functional Groups, Methods of Preparation, and Methods of Their Use," cedida a Squire Sanders LLP, número de expediente 108843.00015, y presentada el 11 de octubre de 2013.

10

En algunos ejemplos, los aminoácidos no naturales que comprenden grupos funcionales tetrazina se usan junto con aminoácidos no naturales que comprenden otros grupos funcionales. Este enfoque puede usarse, por ejemplo, para producir anticuerpos que comprenden los residuos de aminoácidos no naturales con dos o más tipos de grupos funcionales diferentes. En algunos ejemplos, los anticuerpos comprenden aminoácidos no naturales con tres o más tipos de grupos funcionales diferentes.

15

En ejemplos ventajosos, se proporcionan anticuerpos que comprenden uno o más de los aminoácidos no naturales que comprenden fracciones tetrazina, descritos en la presente, junto con uno o más de otros aminoácidos no naturales que comprenden una fracción azida. Esta combinación de aminoácidos reactivos facilita dos reacciones independientes en sitios específicos en el anticuerpo. Una molécula que comprende un alqueno tensionado puede reaccionar selectivamente con una o más fracciones de tetrazina. Otra molécula que comprende un grupo alquino puede reaccionar con la una o más fracciones azida. Ventajosamente, puede haber poca o ninguna reacción cruzada entre las ligaciones de tetrazina y las condensaciones de azida-alquino.

20

La incorporación de la funcionalidad tetrazina y azida en un único anticuerpo permite, por ejemplo, la conjugación controlada de más de una molécula de carga con la cadena de polipéptido. Por ejemplo, en algunos ejemplos, una primera carga comprende un grupo funcional alqueno tensionado, que permite la reacción con residuos de aminoácidos que comprenden tetrazina, mientras que una segunda carga comprende un grupo alquino funcional, que permite la reacción con residuos de aminoácidos que comprenden azida. Se pueden usar también otras cargas útiles, que comprenden grupos funcionales adicionales. Los grupos funcionales transportados por tales cargas útiles adicionales pueden reaccionar con cualquier otro grupo funcional adecuado, tal como un grupo funcional en un residuo de aminoácido no natural adicional o un residuo de aminoácido natural.

25

En algunos ejemplos, un aminoácido no natural que comprende un grupo alifático puede incorporarse en un anticuerpo. Las composiciones y métodos para la incorporación de aminoácidos no naturales que comprenden grupos alifáticos en los polipéptidos se describen en el documento WO 2010/139948. La incorporación de aminoácidos no naturales que comprenden grupos alifáticos puede ser ventajosa, por ejemplo, en casos en los que la incorporación de aminoácidos no naturales que comprenden grupos aromáticos provocaría un plegamiento erróneo o una pérdida de la función de la proteína. Los aminoácidos no naturales que comprenden grupos alifáticos pueden comprender cualquier grupo funcional biortogonal adecuado para usar en reacciones químicas, que incluye cualquiera de los grupos biortogonales descritos en la presente descripción. En ciertos ejemplos, los aminoácidos no naturales que comprenden grupos alifáticos comprenden un grupo funcional azida. En algunos ejemplos, los aminoácidos no naturales que comprenden grupos alifáticos comprenden un grupo funcional tetrazina.

30

Cualquier aminoácido alifático no natural adecuado puede usarse. Los ejemplos de aminoácidos alifáticos no naturales adecuados incluyen N6-[(2-propinilo)oxi]carbonil]-L-lisina, N6-[(2-azidoetoxi)carbonil]-L-lisina, y ácido (S)-2-amino-6((pent-4-enilo)oxi)carbonilamino)hexanoico.

35

Los aminoácidos alifáticos no naturales pueden incorporarse en una cadena de polipéptido usando una aminoacil ARNt sintetasa adecuada, tal como cualquiera de las aminoacil ARNt sintetetas adecuadas descritas en el documento WO 2010/139948. En ciertos ejemplos, puede usarse un par ortogonal de *Methanosarcina barkeri* MS pirrolidil-ARNt sintetasa/ARNt_{CUA} para dirigir la incorporación sitio-específica, eficiente, de aminoácidos alifáticos no naturales en polipéptidos. El gen PylS de *Methanosarcina barkeri* codifica la proteína MbPylRS ARNt sintetasa, y el gen PylT codifica el ARNt de MbtRNA_{CUA}.

40

Un aminoácido alifático no natural puede usarse para reemplazar cualquier aminoácido de origen natural distinto de triptófano, fenilalanina, o tirosina. En algunos ejemplos, un aminoácido alifático no natural puede usarse para reemplazar cualquier aminoácido no aromático. En algunos ejemplos, un aminoácido alifático no natural puede usarse

para reemplazar cualquier aminoácido alifático. En algunos ejemplos, un aminoácido alifático no natural puede usarse para reemplazar un aminoácido seleccionado de lisina, ácido aspártico, serina, cisteína, treonina, valina o isoleucina. En algunos ejemplos, un aminoácido alifático no natural puede usarse para reemplazar cualquiera de serina, cisteína, treonina, valina o isoleucina. En algunos ejemplos, un aminoácido alifático no natural puede usarse para reemplazar un aminoácido cargado tal como lisina o ácido aspártico. En algunos ejemplos, un aminoácido alifático no natural puede usarse para reemplazar un aminoácido tipo hidroxilo tal como serina, cisteína, o treonina. En ejemplos particularmente ventajosos, un aminoácido alifático no natural puede usarse para reemplazar valina o isoleucina.

Enlazadores y cargas útiles

En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende un aminoácido no natural que tiene un grupo reactivo, como se describió anteriormente. El experto en la técnica puede usar el grupo reactivo para enlazar el anticuerpo a cualquier entidad molecular capaz de formar un enlace covalente con el aminoácido no natural, directa o indirectamente a través de un enlazador. En algunos ejemplos, el enlazador es un enlazador de escisión. En algunos ejemplos, el enlazador no es un enlazador de escisión.

Los enlazadores útiles incluyen los descritos en la sección anterior. En ciertos ejemplos, el enlazador es cualquier enlazador divalente o multivalente conocido por los expertos en la técnica. Generalmente, el enlazador es capaz de formar enlaces covalentes con la fracción funcional R y el carbón alfa del aminoácido no natural. Enlazadores divalentes útiles son un enlace, alquileo, alquileo sustituido, heteroalquileo, heteroalquileo sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno y heteroarileno sustituido. En ciertos ejemplos, el enlazador es C₁₋₁₀ alquileo o C₁₋₁₀ heteroalquileo.

La carga molecular puede ser cualquier entidad molecular que el experto en la técnica desee conjugar con el anticuerpo. En ciertos ejemplos, la carga es una fracción terapéutica. En tal ejemplo, el conjugado de anticuerpo puede usarse para dirigir la fracción terapéutica a su objetivo molecular. En ciertos ejemplos, la carga es una fracción marcadora. En tales ejemplos, el conjugado de anticuerpo puede usarse para detectar la unión del anticuerpo a su objetivo. En ciertos ejemplos, la carga es una fracción citotóxica. En tales ejemplos, el conjugado puede usarse para dirigir la fracción citotóxica a una célula enferma, por ejemplo una célula de cáncer, para iniciar la destrucción o eliminación de la célula. Los conjugados que comprenden otras cargas moleculares evidentes para los expertos en la técnica están dentro del alcance de los conjugados descritos en la presente descripción.

En ciertos ejemplos, un conjugado puede tener una carga seleccionada del grupo que consiste en un marcador, un colorante; un polímero, un polímero soluble en agua, polietilenglicol, un derivado de polietilenglicol, un fotorreticulador, un compuesto citotóxico, un radionucleido, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un quelante de metales, un cofactor, un ácido graso, un carbohidrato, un polinucleótido, un DNA, un RNA, un polinucleótido antisentido, un péptido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un ácido nucleico inhibitorio, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, una fracción que contiene metales, una fracción radioactiva, un grupo funcional novedoso, un grupo que interactúa de manera covalente o no con otras moléculas, una fracción fotoestabilizada, una fracción fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, una fracción que incorpora un átomo pesado, un grupo que puede escindirse químicamente, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unido a un carbono, un agente activo redox, un amino tioácido, una fracción tóxica, una fracción marcada isotópicamente, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo electrón denso, un grupo magnético, un grupo intercalante, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente biológicamente activo, un marcador detectable, una molécula pequeña, o cualquier combinación de estos.

Las cargas de fármacos incluyen cualquier fármaco citotóxico, citostático o inmunomodulador. Las clases útiles de agentes citotóxicos o inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, ligandos de unión al surco menor de ADN, inhibidores de replicación de ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tales como cis-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino tri-nuclear y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, inhibidores de calmodulina, sensibilizadores de la quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, maitansinoides, nitrosoureas, platinoles, compuestos formadores de poro, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores de radiación, rapamicinas, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides vinca, o similares.

Los agentes citotóxicos o inmunomoduladores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramycin (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, caliqueamicina, derivados de caliqueamicina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, citidina arabinosida, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (antes actinomicina), daunorubicina, decarbazina, DM1, DM4, docetaxel, doxorubicina, etopósido, un estrógeno, 5-fluorodeoxiuridina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, gramicidina D, hidroxiaurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), maitansine, mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, palitoxin, plicamicina, procarbazona, rizoxina, estreptozaotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

5 En algunos ejemplos, los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, ligandos de unión al surco menor de ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas, un compuesto CBI; ver además las patentes de Estados Unidos núm. 6,130,237), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides vinca, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorubicina, echinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptoficinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina, y mitoxantrona.

10 En algunos ejemplos, la carga es un agente anti-tubulina. Ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen, pero no se limitan a, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik) y alquiloides vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, y vinorelbina). Otros agentes anti-tubulina incluyen, por ejemplo, derivados de bacatina, análogos de taxanos, epotilonas (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimid, estramustina, criptoficinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida y eleuterobina.

15 En ciertos ejemplos, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes anti tubulina. Por ejemplo, en ejemplos específicos, el maitansinoide puede ser maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; ver, además Chari y otros, 1992, Cancer Res. 52:127-131).

20 En algunos ejemplos, la carga es una auristatina, tal como auristatina E o un derivado de esta. Por ejemplo, el derivado de auristatina E puede ser un éster formado entre auristatina E y un ceto ácido. Por ejemplo, la auristatina E puede hacerse reaccionar con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados de auristatina típicos incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y la estructura de los derivados de auristatina se describen en la publicación de las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. 2003-0083263, 2005-0238649 y 2005-0009751; Publicación Internacional de patente núm. WO 04/010957, Publicación Internacional de patente núm. WO 02/088172, y patentes de Estados Unidos núms. 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; y 4,486,414.

En algunos ejemplos, la carga no es un radioisótopo. En algunos ejemplos, la carga no es radioactiva.

30 En algunos ejemplos, la carga es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de la purina (por ejemplo, azotioprina o micofenolato mofetilo), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, ganciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavarina, azidotimidina, citidina arabinósido, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscarnet o trifluridina.

35 En otros ejemplos, la carga es tacrolimus, ciclosporina, FU506 o rapamicina. En ejemplos adicionales, el fármaco es aldesleukina, alemtuzumab, alitreinoin, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, bexaroteno, bexaroteno, calusterona, capecitabina, celecoxib, cladribina, Darbepoetin alfa, Denileukin difitox, dexrazoxano, propionato de dromostanolona, epirubicina, Epoetin alfa, estramustina, exemestano, Filgrastim, floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicin (MILOTARG), goserelin, idarubicina, ifosfamida, imatinib mesilato, Interferón alfa-2a, irinotecán, letrovorina, levamisol, mecloretamina o mostaza nitrogenada, megestrol, mesna, metotrexato, metoxsalen, mitomicina C, mitotano, fenpropionato de nandrolona, oprelvequin, oxaliplatino, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pentostatina, pipobroman, plicamicina, porfímero sódico, procarbazona, quinacrina, rasburicasa, Rituximab, Sargramostim, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, toremifeno, Tositumomab, Tra stuzumab (HERCEPTIN), tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina o zoledronatovincristina, vinorelbina o zoledronato.

45 En algunos ejemplos, la carga es un agente inmunomodulador. El agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, tacrolimus, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetilo o metotrexato. Alternativamente, el agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide (por ejemplo, cortisol o aldosterona) o un análogo de glucocorticoide (por ejemplo, prednisona o dexametasona).

50 En algunos ejemplos, el agente inmunomodulador es un agente antiinflamatorio, tal como derivados arilcarboxílicos, derivados que contienen pirazol, derivados de oxicam y derivados del ácido nicotínico. Clases de agentes antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, inhibidores de ciclooxigenasa, inhibidores de 5-lipoxigenasa, y antagonistas del receptor de leucotrieno.

55 Los inhibidores de ciclooxigenasa adecuados incluyen ácido meclofenámico, ácido mefenámico, carprofeno, diclofenaco, diflunisal, fenbufeno, fenoprofeno, indometacina, cetoprofeno, nabumetona, sulindaco, tenoxicam y tolmetina.

60 Los inhibidores de lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores redox (por ejemplo, derivados de catecol-butano, ácido nordihidroguayarático (NDGA), masoprocol, fenidona, lanopalen, indazolinonas, nafazatrón, benzofuranol, alquilhidroxilamina), e inhibidores no redox (por ejemplo, hidroxitiazoles, metoxialquiltiazoles, benzopiranos y sus derivados, metoxitetrahidropirano, ácidos boswélicos y derivados acetilados de ácidos boswélicos, y ácidos quinolinmetoxifenilacéticos sustituidos con radicales cicloalquilo) y precursores de inhibidores redox.

65

Otros inhibidores de lipoxigenasa adecuados incluyen antioxidantes (por ejemplo, fenoles, galato de propilo, flavonoides y/o sustratos naturales que contienen flavonoides, derivados hidroxilados de las flavonas, flavonol, dihidroquercetina, luteolina, galangina, orobol, derivados de chalcona, 4,2',4'-trihidroxichalcona, orto-aminofenoles, N-hidroxiureas, benzofuranos, ebselen y especies que aumentan la actividad de las selenoenzimas reductoras), agentes quelantes de hierro (por ejemplo, ácidos hidroxámicos y sus derivados, N-hidroxiureas, 2-bencil-1-naftol, catecoles, hidroxilaminas, carnosol trolox C, catecol, naftol, sulfasalazina, zyleuton, ácido 5-hidroxiantranílico y ácidos 4-(omega-arilalquil) fenilalcanoicos), compuestos que contienen imidazol (por ejemplo, ketoconazol e itraconazol), fenotiazinas y derivados de benzopirano.

Aún otros inhibidores de lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, ácidos octadecatetraenoico, eicosatetraenoico, docosapentaenoico, eicosahexaenoico y docosahexaenoicos y sus ésteres, PGE1 (prostaglandina E1), PGA2 (prostaglandina A2), viprostol, ácidos 15-monohidroxieicosatetraenoico, 15-monohidroxi-eicosatrienoico y 15-monohidroxieicosapentaenoico, y leucotrienos B5, C5 y D5), compuestos que interfieren con los flujos de calcio, fenotiazinas, difenilbutilaminas, verapamilo, fusósido, curcumina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ETYA), hidroxifenilretinamida, lonapaleno, esculina, dietilcarbamazina, fenantrolina, baicaleína, proxicromil, tioéteres, sulfuro de dialilo y sulfuro de di-(1-propenilo).

Antagonistas del receptor de leucotrienos incluyen calcitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselen, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingleheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck and Co. MK-591, Merck and Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK&F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 y Teijin TEI-1338.

Otras cargas de fármacos incluyen compuestos químicos útiles en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen Erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), Bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), Fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), Sutent (SU11248, Pfizer), Letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), Oxaliplatino (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), Leucovorin, Rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), Lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), Lonafarnib (SCH 66336), Sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs), y Gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilomelamina; acetogéninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético de tocotecán); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y critoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; spongistatina; mostaza de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato óxido de mecloretamina, melfalano, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enediina (por ejemplo, caliceamicina, especialmente caliceamicina γ11 y caliceamicina omegall (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, que incluye dinemicina A; bisfosfonatos, tal como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatin y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinisa, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® (doxorubicina), morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxi-doxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcellomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina; análogos de pirimidina tal como ancitabina, 6-azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostanol, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquna; 2,2',2"-triclortrietilamina; trichothecenas (especialmente toxina T-2, verracurin A, roridin A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina;

arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, *p. ej.*, TAXOL® (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® (libre de Cremophor), formulaciones de paclitaxel como nanopartículas modificadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), y TAXOTERE® (doxetaxel; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; GEMZAR® (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® (vinorelbina); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tal como ácido retinoico; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

Otras cargas útiles incluyen: (i) agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestanie, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis), y ARIMIDEX (anastrozol; AstraZeneca); (iii) anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de proteína cinasa (v) inhibidores de lípido cinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación aberrante de células, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; (vii) ribozimas tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas tales como vacunas de terapias génicas, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, y VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; un inhibidor de topoisomerasa 1 tal como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes anti-angiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y (x) sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores. Otros agentes anti-angiogénicos incluyen los inhibidores de MMP-2 (metaloproteinasa de la matriz 2), inhibidores de MMP-9 (metaloproteinasa de la matriz 9), inhibidores de COX-II (ciclooxigenasa II), e inhibidores de la tirosina cinasa del receptor de VEGF. Ejemplos de tales inhibidores de metaloproteinasas de matriz útiles que se pueden usar en combinación con los presentes compuestos / composiciones se describen en WO 96/33172, WO 96/27583, EP 818442, EP 1004578, WO 98/07697, WO 98/03516, WO 98/34918, WO 98/34915, WO 98/33768, WO 98/30566, EP 606,046, EP 931,788, WO 90/05719, WO 99/52910, WO 99/52889, WO 99/29667, WO 99/07675, EP 945864, patentes de los Estados Unidos núm. 5,863,949, patente de Estados Unidos núm. 5,861,510, y EP 780,386. Los ejemplos de inhibidores de la tirosina cinasa del receptor de VEGF incluyen 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina (ZD6474; Ejemplo 2 dentro de WO 01/32651), 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-pirrolidin-1-ilpropoxi)-quinazolina (AZD2171; Ejemplo 240 dentro de WO 00/47212), vatalanib (PTK787; WO 98/35985) y SU11248 (sunitinib; WO 01/60814), y compuestos tales como los descritos en las publicaciones del PCT núms. WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856, y WO 98/13354).

En ciertos ejemplos, la carga es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En ciertos ejemplos, el fragmento o anticuerpo de carga puede ser codificado por cualquiera de los genes de inmunoglobulina reconocidos por los expertos en la técnica. Los genes de inmunoglobulina incluyen, pero no se limitan a, los genes de región constante κ , λ , α , y (IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4), δ , ϵ y μ , así como a los genes de región variable de inmunoglobulina. El término incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo reconocidos por los expertos en la técnica, y variantes de estos. Los fragmentos ilustrativos incluyen pero no se limitan a Fv, Fc, Fab, y (Fab')₂, Fv de cadena simple (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones marco, regiones constantes, y similares.

En ciertos ejemplos, la carga es uno o más polímeros solubles en agua. Una amplia variedad de polímeros macromoleculares y otras moléculas pueden enlazarse a los polipéptidos de unión a antígeno de la presente descripción para modular las propiedades biológicas del anticuerpo, y/o proporcionar nuevas propiedades biológicas al anticuerpo. Estos polímeros macromoleculares pueden enlazarse al anticuerpo a través de un aminoácido codificado naturalmente, a través de un aminoácido no codificado naturalmente, o cualquier sustituyente funcional de un aminoácido natural o no natural, o cualquier sustituyente o grupo funcional añadido a un aminoácido natural o no natural. El peso molecular del polímero puede ser de un rango amplio, que incluye pero no se limita a, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100,000 Da o más.

El polímero seleccionado puede ser soluble en agua de modo que la proteína a la que está unido no precipita en un ambiente acuoso, tal como un ambiente fisiológico. El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Preferentemente, el polímero será farmacéuticamente aceptable para el uso terapéutico de la preparación del producto final.

La proporción de moléculas de polietilenglicol respecto a moléculas de anticuerpo variará, al igual que sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la relación óptima (en términos de eficacia de reacción en el hecho de que hay un exceso mínimo de proteína o polímero sin reaccionar) puede determinarse por el peso molecular del polietilenglicol seleccionado y en el número de grupos reactivos disponibles. Como se relaciona con el peso molecular, típicamente cuanto mayor es el peso molecular del polímero, menor es el número de moléculas de polímero que pueden unirse a la proteína. Similarmente, la ramificación del polímero debe tenerse en cuenta al optimizar estos

parámetros. Generalmente, cuanto mayor es el peso molecular (o más ramificaciones) mayor es la relación polímero:proteína.

5 El polímero soluble en agua puede ser de cualquier forma estructural que incluye, pero no se limita a, lineal, bifurcada o ramificada. Típicamente, el polímero soluble en agua es un poli(alquilenglicol), tal como poli(etilenglicol) (PEG), pero también pueden emplearse otros polímeros solubles en agua. A modo de ejemplo, el PEG se usa para describir ciertos ejemplos de esta descripción.

10 El PEG es un polímero soluble en agua bien conocido que está disponible comercialmente o se puede preparar mediante polimerización con apertura del anillo de etilenglicol de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (Sandler y Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, Nueva York, Vol. 3, páginas 138-161). El término "PEG" se usa ampliamente para abarcar cualquier molécula de polietilenglicol, sin importar el tamaño o la modificación en un extremo del PEG, y se puede representar como unida al anticuerpo por la fórmula: $XO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$ donde n es 2 a 10,000 y X es H o una modificación terminal, que incluye pero no se limita a, un C_{1-4} alquilo.

15 En algunos casos, un PEG usado en la descripción termina en un extremo con hidroxilo o metoxi, es decir, X es H o CH_3 ("metoxi PEG"). Alternativamente, el PEG puede terminar con un grupo reactivo, formando así un polímero bifuncional. Los grupos reactivos típicos pueden incluir los grupos reactivos que se usan comúnmente para reaccionar con los grupos funcionales encontrados en los 20 aminoácidos comunes (que incluyen pero no se limitan a, grupos maleimida, carbonatos activados (que incluyen, pero no se limitan a, éster de p-nitrofenilo), ésteres activados (que incluyen pero no se limitan a, N-hidroxisuccinimida, éster de p-nitrofenilo) y aldehídos), así como grupos funcionales que son inertes a los 20 aminoácidos comunes pero que reaccionan específicamente con grupos funcionales complementarios presentes en aminoácidos no codificados de forma natural (que incluyen, pero no se limitan a, grupos azida, grupos alquino). Se observa que el otro extremo del PEG, que se muestra en la fórmula anterior por Y, se unirá directa o indirectamente a un polipéptido de unión a antígeno a través de un aminoácido de origen natural o no codificado de forma natural. Por ejemplo, Y puede ser un enlace de amida, carbamato o urea a un grupo amina (que incluye, pero no se limita a, épsilon amina de lisina o el extremo N-terminal) del polipéptido. Alternativamente, Y puede ser un enlace de maleimida a un grupo tiol (que incluye, pero no se limita a, el grupo tiol de cisteína). Alternativamente, Y puede ser un enlace a un residuo no comúnmente accesible a través de los 20 aminoácidos comunes. Por ejemplo, un grupo azida en el PEG puede hacerse reaccionar con un grupo alquino en el anticuerpo para formar un producto de cicloadición [3+2] de Huisgen. Alternativamente, un grupo alquino en el PEG puede hacerse reaccionar con un grupo azida presente en un aminoácido no codificado naturalmente para formar un producto similar. Un grupo alqueno tensionado en el PEG puede hacerse reaccionar con un grupo tetrazina en el anticuerpo para formar un producto de ligadura de tetrazina. Alternativamente, un grupo tetrazina en el PEG puede hacerse reaccionar con el grupo alqueno tensionado presente en un aminoácido no codificado naturalmente para formar un producto similar.

40 En algunos ejemplos, un nucleófilo fuerte (que incluye pero no se limita a, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina, semicarbazida) puede hacerse reaccionar con un grupo aldehído o cetona presente en un aminoácido no codificado naturalmente para formar una hidrazona, oxima o semicarbazona, según corresponda, que en algunos casos puede reducirse aún más mediante el tratamiento con un agente reductor apropiado. Alternativamente, el nucleófilo fuerte puede incorporarse en el anticuerpo a través de un aminoácido no codificado de forma natural y usarse para reaccionar preferentemente con un grupo cetona o aldehído presente en el polímero soluble en agua.

45 Cualquier masa molecular para un PEG se puede usar como prácticamente deseable, que incluye pero no se limita a, de aproximadamente 100 Daltons (Da) a 100,000 Da o más según se desee (que incluyen pero no se limitan a, algunas veces 0.1-50 kDa o 10-40 kDa). Los PEG de cadena ramificada, que incluyen pero no se limitan a, moléculas de PEG donde cada cadena tiene un PM que varía de 1-100 kDa (que incluye pero no se limita a, 1-50 kDa o 5-20 kDa) también pueden usarse. Un rango amplio de moléculas de PEG se describen en, pero no se limitan a, el catálogo Shearwater Polymers, Inc., catálogo Nektar Therapeutics.

50 Generalmente, al menos un extremo de la molécula de PEG está disponible para la reacción con el aminoácido no codificado de forma natural. Por ejemplo, los derivados de PEG que portan fracciones alquino y azida para la reacción con cadenas laterales de aminoácidos pueden usarse para unir el PEG a los aminoácidos no codificados naturalmente como se describe en la presente descripción. Si el aminoácido no codificado naturalmente comprende una azida, entonces el PEG típicamente contendrá ya sea una fracción alquino para efectuar la formación del producto de cicloadición [3+2] o una especie de PEG activada (es decir, éster, carbonato) que contiene un grupo fosfina para efectuar la formación del enlace amida. Alternativamente, si el aminoácido no codificado naturalmente comprende un alquino, entonces el PEG típicamente contendrá una fracción de azida para efectuar la formación del producto de cicloadición [3+2] de Huisgen. Similarmente, si el aminoácido no codificado naturalmente comprende una tetrazina, entonces el PEG típicamente contendrá un alqueno tensionado. Alternativamente, si el aminoácido no codificado naturalmente comprende un alqueno tensionado, entonces el PEG típicamente contendrá una tetrazina. Si el aminoácido no codificado naturalmente comprende un grupo carbonilo, el PEG típicamente comprenderá un potente nucleófilo (que incluye pero no se limitan a, una funcionalidad hidrazida, hidrazina, hidroxilamina, o semicarbazida) para efectuar la formación de los enlaces de hidrazona, oxima, y semicarbazona correspondientes, respectivamente. En otras alternativas, puede usarse un inverso de la orientación de los grupos reactivos descritos anteriormente, es decir, una

fracción azida en el aminoácido no codificado de forma natural puede hacerse reaccionar con un derivado de PEG que contiene un alquino.

5 En algunos ejemplos, la variante de anticuerpo con un derivado de PEG contiene una funcionalidad química que es reactiva con la funcionalidad química presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado naturalmente.

10 En ciertos ejemplos, la carga es un polímero que contiene azida, tetrazina, alqueno tensionado, o acetileno que comprende una cadena principal del polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100,000 Da. La cadena principal de polímero del polímero soluble en agua puede ser poli(etilenglicol). Sin embargo, debe entenderse que una amplia variedad de polímeros solubles en agua que incluyen pero no se limitan a poli(etilenglicol) y otros polímeros relacionados, que incluyen poli(dextrano) y poli(propilenglicol), también son adecuados para su uso en la práctica de esta descripción y que el uso del término PEG o poli (etilenglicol) pretende abarcar e incluir todas estas moléculas. El término PEG incluye, pero no se limita a, poli (etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo PEG bifuncional, PEG multi-brazos, PEG derivatizado, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG pendiente (es decir, PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgantes de la cadena principal del polímero), o PEG con enlaces degradables en el mismo.

20 La cadena principal del polímero puede ser lineal o ramificada. Los esqueletos ramificados del polímero son generalmente conocidos en la técnica. Típicamente, un polímero ramificado tiene una fracción núcleo ramificado central y una pluralidad de cadenas lineales de polímero unidas al núcleo ramificado central. El PEG se usa comúnmente en formas ramificadas que se pueden preparar mediante la adición de óxido de etileno a diversos polioles, tales como glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol y sorbitol. La fracción de rama central también puede derivarse de varios aminoácidos, tales como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado puede representarse en forma general como R(-PEG-OH)_m en el cual R se deriva de una fracción núcleo, tal como glicerol, oligómeros de glicerol, o pentaeritritol, y m representa el número de brazos. Las moléculas de PEG multi-brazos tal como las descritas en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,932,462 5,643,575; 5,229,490; 4,289,872; solicitudes de patente de Estados Unidos 2003/0143596; WO 96/21469; y WO 93/21259, pueden usarse como la cadena principal del polímero.

30 PEG ramificado también puede estar en forma de un PEG bifurcado representado por PEG(-YCHZ₂)_n, donde Y es un grupo de enlace y Z es un grupo terminal activado unido a CH por una cadena de átomos de longitud definida.

Otra forma ramificada aún, el PEG colgante, tiene grupos reactivos, tales como carboxilo, a lo largo de la cadena principal de PEG en lugar de al final de las cadenas de PEG.

35 Además de estas formas de PEG, el polímero también se puede preparar con enlaces débiles o degradables en la cadena principal. Por ejemplo, los PEG pueden prepararse con enlaces éster en la cadena principal del polímero que se someten a hidrólisis. Como se muestra a continuación, esta hidrólisis da como resultado la escisión del polímero en fragmentos de menor peso molecular: -PEG-CO₂-PEG-+H₂O→PEG-CO₂H+HO-PEG- Los expertos en la técnica entenderán que el término poli(etilenglicol) o PEG representa o incluye todas las formas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, las descritas en la presente descripción.

40 Muchos otros polímeros también son adecuados para su uso en la presente descripción. En algunos ejemplos, cadenas principales del polímero que son solubles en agua, con 2 a aproximadamente 300 terminales, son particularmente útiles. Ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, otros poli(alquilenglicoles), tal como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de estos (que incluyen pero no se limitan a copolímeros de etilenglicol y propilenglicol), terpolímeros de estos, mezclas de estos, y similares. Aunque el peso molecular de cada cadena de la cadena principal del polímero puede variar, típicamente está en el intervalo de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100,000 Da, a menudo de aproximadamente 6,000 Da a aproximadamente 80,000 Da.

50 Aquellos con experiencia en la técnica reconocerán que la lista anterior para cadenas principales sustancialmente solubles en agua no es de ninguna manera exhaustiva y es meramente ilustrativa, y que todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como adecuados para su uso.

55 En algunos ejemplos de la presente descripción los derivados de polímeros son "multi-funcionales", lo que significa que la cadena principal del polímero tiene al menos dos términos, y posiblemente tanto como aproximadamente 300 terminales, funcionalizados o activados con un grupo funcional. Los derivados poliméricos multifuncionales incluyen, pero no se limitan a, polímeros lineales que tienen dos extremos, cada extremo está unido a un grupo funcional que puede ser el mismo o diferente.

60 En un ejemplo, el derivado de polímero tiene la estructura: X-A-POLY-B - N=N=N en donde: N=N=N es una fracción azida; B es una fracción de enlace, la cual puede estar presente o ausente; POLY es un polímero no antigénico soluble en agua; A es una fracción de enlace, la cual puede estar presente o ausente y la cual puede ser la misma que B o diferente; y X es un segundo grupo funcional. Ejemplos de una fracción de enlace para A y B incluyen, pero no se limitan a, un grupo alquilo con múltiples funcionalidades que contiene hasta 18, y con mayor preferencia entre 1-10 átomos de carbono. Un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno o azufre puede incluirse con la cadena de alquilo. La cadena de alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de una fracción de enlace para A

y B incluyen, pero no se limitan a, un grupo arilo con múltiples funcionalidades, que contiene hasta 10 y con mayor preferencia 5-6 átomos de carbono. El grupo arilo puede sustituirse con uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre. Otros ejemplos de grupos de enlace adecuados incluyen los grupos de enlace descritos en las patentes de Estados Unidos núms. 5,932,462; 5,643,575; y la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2003/0143596. Los expertos en la técnica reconocerán que la lista anterior para las fracciones de enlace de ninguna manera es exhaustiva y es meramente ilustrativa, y que todas las fracciones de enlace que tengan las cualidades descritas anteriormente se consideran adecuadas para su uso en la presente descripción.

Ejemplos de grupos funcionales adecuados para usar como X incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, éster activo, tal como N-hidroxisuccinimidil ésteres y 1-benzotriazolil ésteres, carbonato activo, tal como N-hidroxisuccinimidil carbonatos y 1-benzotriazolil carbonatos, acetal, aldehído, aldehído hidratos, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tresilato, alqueno, cetona, y azida. Como entenderán los expertos en la técnica, la fracción X seleccionada debería ser compatible con el grupo azida de modo que no se produzca la reacción con el grupo azida. Los derivados de polímero que contienen azida pueden ser homobifuncional, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) es además una fracción azida, o heterobifuncional, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente.

El término "protegido" se refiere a la presencia de un grupo protector o fracción que previene la reacción del grupo funcional químicamente reactivo bajo ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará según el tipo de grupo químicamente reactivo que se está protegiendo. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector puede seleccionarse del grupo de terc-butiloxicarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfuro. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como ácido butanoico o propionico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo tal como metilo, etilo o terc-butilo. Otros grupos protectores conocidos en la técnica pueden usarse también en la presente descripción.

Ejemplos específicos de grupos funcionales terminales en la literatura incluyen, pero no se limitan a, N-succinimidil carbonato (ver por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 5,281,698, 5,468,478), amina (ver, por ejemplo, Buckmann y otros Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zaplisky y otros, Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), hidrazida (ver, por ejemplo, Andresz y otros. Makromol. Chem. 179:301 (1978)), succinimidil propionato y succinimidil butanoato (ver, por ejemplo, Olson y otros en Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, págs. 170-181, Harris y Zaplisky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; ver también la patente de Estados Unidos núm. 5,672,662), succinimidil succinato (ver, por ejemplo, Abuchowski y otros, Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) y Joppich y otros Macromol. Chem. 180:1381 (1979), succinimidil éster (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 4,670,417), benzotriazol carbonato (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,650,234), glicidil éter (ver, por ejemplo, Pitha y otros, Eur. J Biochem. 94:11 (1979), Elling y otros, Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991), oxicarbonilimidazol (ver, por ejemplo, Beauchamp, y otros, Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli y otros. J. Controlled Release 1:251 (1985)), p-nitrofenil carbonato (ver, por ejemplo, Veronese, y otros, Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); y Sartore y otros, Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)), aldehído (ver, por ejemplo, Harris y otros J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), patente de Estados Unidos núm. 5,824,784, patente de Estados Unidos núm. 5,252,714), maleimida (ver, por ejemplo, Goodson y otros, Bio/Technology 8:343 (1990), Romani y otros en Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)), y Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), ortopiridil-disulfuro (ver, por ejemplo, Woghiren, y otros. Bioconj. Chem. 4:314(1993)), acrilol (ver, por ejemplo, Sawhney y otros, Macromolecules, 26:581 (1993)), vinilsulfona (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos núm. 5,900,461).

En ciertos ejemplos de la presente descripción, los derivados de polímeros comprenden una cadena principal del polímero que tiene la estructura: $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-N=N=N$ en donde: X es un grupo funcional como se describió anteriormente; y n es aproximadamente 20 a aproximadamente 4000. En otro ejemplo, los derivados de polímeros comprenden una cadena principal del polímero que tiene la estructura: $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-O-(CH_2)_m-W-N=N=N$ en donde: W es una fracción enlazadora alifática o aromática que comprende entre 1-10 átomos de carbono; n es aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; X es un grupo funcional como se describió anteriormente; y m es entre 1 y 10.

En ciertos ejemplos, el derivado de polímero tiene la estructura: X-A-POLY-B - Y en donde: Y es una fracción que comprende un alqueno tensionado; B es una fracción de enlace, la cual puede estar presente o ausente; POLY es un polímero no antigénico soluble en agua; A es una fracción de enlace, la cual puede estar presente o ausente y la cual puede ser la misma que B o diferente; y X es un grupo funcional como se describe en la presente descripción.

En ciertos ejemplos, el derivado de polímero tiene la estructura: X-A-POLY-B - Y en donde: Y es una fracción que comprende una tetrazina; B es una fracción de enlace, la cual puede estar presente o ausente; POLY es un polímero no antigénico soluble en agua; A es una fracción de enlace, la cual puede estar presente o ausente y la cual puede ser la misma que B o diferente; y X es un grupo funcional como se describe en la presente descripción.

En ciertos ejemplos de la presente descripción, los derivados de polímeros comprenden una cadena principal del

polímero que tiene la estructura: $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$ en donde: Y es una fracción que comprende un alqueno tensionado; X es un grupo funcional como se describe en la presente; y n es aproximadamente 20 a aproximadamente 4000.

5 En ciertos ejemplos de la presente descripción, los derivados de polímeros comprenden una cadena principal del polímero que tiene la estructura: $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$ en donde: Y es una fracción que comprende una tetrazina; X es un grupo funcional como se describe en la presente; y n es aproximadamente 20 a aproximadamente 4000.

10 Los derivados de PEG que contienen azida de la descripción pueden prepararse por una variedad de métodos conocidos en la técnica y/o descritos en la presente. En un método, mostrado más abajo, una cadena principal del polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100,000 Da, la cadena principal del polímero que tiene un primer terminal unido a un primer grupo funcional y un segundo terminal unido a un grupo de salida adecuado, se hace reaccionar con un anión azida (que puede combinarse con cualquiera de varios contraiones adecuados, que incluyen sodio, potasio, terc-butilamonio, etc.). El grupo de salida experimenta un desplazamiento nucleofílico y se reemplaza por la fracción azida, proporcionando el polímero PEG deseado que contiene azida como se muestra en lo siguiente: $X-PEG-L+N_3^- \rightarrow X-PEG-N_3$.

20 Como se muestra, una cadena principal del polímero adecuada para usar en la presente descripción tiene la fórmula $X-PEG-L$, en donde PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo funcional que no reacciona con grupos azida y L es un grupo de salida adecuado. Ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, hidroxilo protegido, acetal, alqueno, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, maleimida, ditiopiridina, y vinilpiridina, y cetona. Ejemplos de grupos de salida adecuados incluyen, pero no se limitan a, cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato, y tosilato.

25 En otro método para la preparación de los derivados de polímero que contienen azida de la presente descripción, un agente de enlace que porta una funcionalidad azida se pone en contacto con una cadena principal del polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100,000 Da, en donde el agente de enlace porta una funcionalidad química que reaccionará selectivamente con una funcionalidad química en el polímero PEG, para formar un producto derivado de polímero que contiene azida en donde la azida se separa de la cadena principal del polímero por un grupo de enlace.

30 Un esquema de reacción ilustrativo se muestra a continuación: $X-PEG-M+N-\text{enlazador}-N=N=N \rightarrow PG-X-PEG-\text{enlazador}-N=N=N$ en donde: PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo de terminación de cadena tal como alcoxi o un grupo funcional como se describió anteriormente; y m es un grupo funcional que no reacciona con la funcionalidad azida pero que reaccionará eficientemente y selectivamente con el grupo funcional N.

35 Ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, M que es un ácido carboxílico, carbonato o éster activo si N es una amina; M que es una cetona si N es una hidrazida o fracción aminooxi; M que es un grupo de salida si N es un nucleófilo.

40 Los derivados de PEG que contienen alqueno tensionado pueden prepararse por una variedad de métodos conocidos en la técnica y/o descritos en la presente. En un método para la preparación de un derivado de polímero que contienen alqueno tensionado, un agente de enlace que porta una funcionalidad de alqueno tensionado se pone en contacto con una fracción de carga, en donde el agente de enlace porta una funcionalidad química que reaccionará selectivamente con una funcionalidad química en el polímero PEG, para formar un producto derivado de polímero que contiene alqueno tensionado en donde el alqueno tensionado se separa de la cadena principal del polímero por un grupo de enlace. Los PEG útiles que comprenden alquenos tensionados pueden obtenerse de fuentes comerciales, por ejemplo de Jena Biosciences, o prepararse de acuerdo con técnicas publicadas, por ejemplo Aimetti y otros, 2009, Biomaterials 30:6048-6054.

45 Un esquema de reacción ilustrativo se muestra aquí: $X-PEG-M+N-\text{enlazador}-Y \rightarrow PG-X-PEG-\text{enlazador}-Y$ en donde: Y es una fracción que comprende un alqueno tensionado, PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo de terminación de cadena tal como alcoxi o un grupo funcional como se describe en la presente; y m es un grupo funcional que no reacciona con la funcionalidad de alqueno tensionado pero que reaccionará eficientemente y selectivamente con el grupo funcional N. Ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, M que es un ácido carboxílico, carbonato o éster activo si N es una amina; M que es una cetona si N es una hidrazida o fracción aminooxi; M que es un grupo de salida si N es un nucleófilo.

50 En un método para la preparación de un derivado PEG que contiene alqueno tensionado, una cadena principal del polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100,000 Da, la cadena principal del polímero que tiene un primer extremo unido a un primer grupo funcional y un segundo extremo unido a un grupo nucleofílico adecuado, se hace reaccionar con un compuesto que porta una funcionalidad de alqueno tensionado y un grupo de salida que es adecuado para la reacción con el grupo nucleofílico en el PEG. Cuando el polímero PEG que porta la fracción nucleofílica y la molécula que porta el grupo de salida se combinan, el grupo de salida experimenta un desplazamiento nucleofílico y se reemplaza por la fracción nucleofílica,

proporcionando el polímero deseado que contiene el alqueno tensionado: $X\text{-PEG-Nu+L-A-Y}\rightarrow X\text{-PEG-Nu-A-Y}$, donde Y es una fracción que comprende un alqueno tensionado.

5 Como se muestra, en algunos ejemplos, una cadena principal del polímero preferida para su uso en la reacción tiene la fórmula $X\text{-PEG-Nu}$, en donde PEG es poli(etilenglicol), Nu es una fracción nucleofílica y X es un grupo funcional que no reacciona con Nu, L o la funcionalidad de alqueno tensionado.

10 Ejemplos de Nu incluyen, pero no se limitan a, grupos amina, alcoxi, ariloxi, sulfhidrilo, imino, carboxilato, hidrazida, aminoxi que reaccionarían principalmente a través del mecanismo tipo SN_2 . Los ejemplos adicionales de grupos Nu incluyen los grupos funcionales que reaccionarían principalmente a través de una reacción de adición nucleofílica. Ejemplos de grupos L incluyen cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato, y tosilato y otros grupos que se espera que experimenten un desplazamiento nucleofílico así como cetonas, aldehídos, tioésteres, olefinas, grupos carbonilo alfa-beta insaturados, carbonatos y otros grupos electrofílicos que se espera que experimenten adición por nucleófilos.

15 En ciertos ejemplos, A es un enlazador alifático de entre 1-10 átomos de carbono o un anillo de arilo sustituido de entre 6-14 átomos de carbono. X es un grupo funcional que no reacciona con grupos alqueno tensionados y L es un grupo de salida adecuado.

20 En otro método para la preparación de los derivados de polímeros que contienen alqueno tensionado, un polímero de PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100,000 Da, que porta ya sea un grupo funcional protegido o un agente de terminación de cadena en un extremo y un grupo de salida adecuado en el otro extremo se pone en contacto con una molécula activada que comprende un alqueno tensionado.

25 La purificación del producto crudo puede llevarse a cabo por métodos conocidos que incluyen, pero no se limitan a, precipitación del producto seguido por cromatografía, si fuera necesario.

30 Un ejemplo más específico se muestra más abajo en el caso de diamina PEG, en el que una de las aminas está protegida por una fracción del grupo protector tal como terc-butil-Boc y la diamina PEG monoprottegida resultante se hace reaccionar con un resto de enlace que porta la funcionalidad azida: $\text{BocHN-PEG-NH}_2+\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_3\text{-N=N=N}$, o alqueno tensionado funcionalidad: $\text{BocHN-PEG-NH}_2+\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_3\text{-Y}$, donde Y es una fracción que comprende un alqueno tensionado.

35 En este ejemplo, el grupo amina se puede acoplar al grupo ácido carboxílico usando una variedad de agentes activantes tales como cloruro de tionilo o reactivos de carbodiimida y N-hidroxisuccinimida o N-hidroxibenzotriazol para crear un enlace amida entre el derivado de monoamina PEG y el resto enlazador que porta una azida o alqueno tensionado. Después de la formación exitosa del enlace amida, el derivado que contiene alqueno tensionado o azida protegida con N-terc-butil-Boc puede usarse directamente para modificar moléculas bioactivas o puede elaborarse adicionalmente para instalar otros grupos funcionales útiles. Por ejemplo, el grupo N-t-Boc puede hidrolizarse mediante tratamiento con ácido fuerte para generar una omega-amino-PEG-azida o un omega-amino-PEG-alqueno tensionado. La amina resultante puede usarse como un puño sintético para instalar otras funcionalidades útiles tales como grupos maleimida, disulfuros activados, ésteres activados, etc., para la creación de valiosos reactivos heterobifuncionales.

45 Los derivados heterobifuncionales son particularmente útiles cuando se desea enlazar diferentes moléculas a cada extremo del polímero. Por ejemplo, el omega-N-amino-N-azido PEG permitiría la unión de una molécula que tiene un grupo electrofílico activado, tal como un aldehído, cetona, éster activado, carbonato activado, etc. a un extremo del PEG y una molécula que tiene un grupo acetileno al otro extremo del PEG.

50 En otro ejemplo de esta descripción, el derivado de polímero tiene la estructura: $X\text{-A-POLY-B-C=C-R}$ en donde: R puede ser ya sea H o un grupo alquilo, alqueno, alquioxo, o arilo o arilo sustituido; B es una fracción de enlace, que puede estar presente o ausente; POLY es un polímero no antigénico soluble en agua; A es una fracción de enlace, que puede estar presente o ausente y que puede ser la misma que B o diferente; y X es un segundo grupo funcional.

55 En otro ejemplo de esta descripción, el derivado de polímero tiene la estructura: $X\text{-A-POLY-B-Y}$, donde Y es una fracción que comprende un alqueno tensionado; B es una fracción de enlace, la cual puede estar presente o ausente; POLY es un polímero no antigénico soluble en agua; A es una fracción de enlace, la cual puede estar presente o ausente y la cual puede ser la misma que B o diferente; y X es un segundo grupo funcional.

60 Ejemplos de una fracción de enlace para A y B incluyen, pero no se limitan a, un grupo alquilo con múltiples funcionalidades que contiene hasta 18, y con mayor preferencia entre 1-10 átomos de carbono. Un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno o azufre puede incluirse con la cadena de alquilo. La cadena de alquilo también puede ser ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de una fracción de enlace para A y B incluyen, pero no se limitan a, un grupo arilo con múltiples funcionalidades, que contiene hasta 10 y con mayor preferencia 5-6 átomos de carbono. El grupo arilo puede sustituirse con uno o más átomos de carbono, átomos de nitrógeno, oxígeno, o azufre. Otros ejemplos de grupos de enlace adecuados incluyen los grupos de enlace descritos en las patentes de Estados Unidos núms. 5,932,462 y 5,643,575 y la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0143596. Los expertos en la técnica reconocerán que la lista anterior para las fracciones de enlace de ninguna manera es exhaustiva y pretende ser

meramente ilustrativa, y que una amplia variedad de fracciones de enlace que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como útiles en la presente descripción.

5 Ejemplos de grupos funcionales adecuados para usar como X incluyen hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, éster activo, tal como N-hidroxisuccinimidil ésteres y 1-benzotriazolil ésteres, carbonato activo, tal como N-hidroxisuccinimidil carbonatos y 1-benzotriazolil carbonatos, acetal, aldehído, aldehído hidratado, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, y tresilato, alqueno, cetona, y acetileno. Como se comprenderá, la fracción X seleccionada debería ser compatible con el grupo acetileno de modo que no se produzca la reacción con el grupo acetileno. Si se usa un grupo alqueno tensionado, la fracción X seleccionada debe ser compatible con el grupo alqueno tensionado, de manera que la reacción con el grupo alqueno tensionado no ocurra. Los derivados de polímeros que contienen acetileno pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) también es una fracción de acetileno, o heterobifuncional, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente. Similarmente, los derivados de polímero que contienen alqueno tensionado pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) también es una fracción de alqueno tensionado, o heterobifuncional, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente.

20 En otro ejemplo de la presente descripción, los derivados de polímeros comprenden una cadena principal del polímero que tiene la estructura: $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-O-(CH_2)_m-C=CH$ en donde: X es un grupo funcional como se describió anteriormente; n es aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; y m es entre 1 y 10. Ejemplos específicos de cada uno de los polímeros PEG heterobifuncionales se muestran más abajo.

25 En otro ejemplo de la presente descripción, los derivados de polímeros comprenden una cadena principal del polímero que tiene la estructura: $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-O-(CH_2)_m-Y$ en donde: Y es una fracción que comprende un alqueno tensionado; X es un grupo funcional como se describe en la presente; n es aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; y m es entre 1 y 10.

30 Los derivados de PEG que contienen acetileno de la descripción pueden prepararse usando métodos conocidos para los expertos en la técnica y/o descritos en la presente. En un método, una cadena principal del polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100,000 Da, la cadena principal del polímero que tiene un primer extremo unido a un primer grupo funcional y un segundo extremo unido a un grupo nucleofílico adecuado, se hace reaccionar con un compuesto que tiene tanto una funcionalidad de acetileno como un grupo saliente que es adecuado para la reacción con el grupo nucleófilo en el PEG. Cuando el polímero de PEG que lleva la fracción nucleofílica y la molécula que porta el grupo saliente se combinan, el grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y se reemplaza por la fracción nucleofílica, proporcionando el polímero que contiene acetileno deseado: $X-PEG-Nu+L-A-C \rightarrow X-PEG-Nu-A-C=CR'$.

40 Como se muestra, una cadena principal del polímero preferida para su uso en la reacción tiene la fórmula X-PEG-Nu, en donde PEG es poli(etilenglicol), Nu es una fracción nucleofílica y X es un grupo funcional que no reacciona con Nu, L o la funcionalidad acetileno.

45 Ejemplos de Nu incluyen, pero no se limitan a, grupos amina, alcoxi, ariloxi, sulfhidrilo, imino, carboxilato, hidrazida, aminooxi que reaccionarían principalmente a través de un mecanismo de tipo SN2. Los ejemplos adicionales de grupos Nu incluyen aquellos grupos funcionales que reaccionarían principalmente a través de una reacción de adición nucleofílica. Ejemplos de grupos L incluyen cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato, y tosilato y otros grupos que se espera que experimenten un desplazamiento nucleofílico así como cetonas, aldehídos, tioésteres, olefinas, grupos carbonilo alfa-beta insaturados, carbonatos y otros grupos electrofílicos que se espera que experimenten adición por nucleófilos.

50 En otro ejemplo de la presente descripción, A es un enlazador alifático de entre 1-10 átomos de carbono o un anillo de arilo sustituido de entre 6-14 átomos de carbono. X es un grupo funcional que no reacciona con grupos azida y L es un grupo de salida adecuado.

55 En otro método para la preparación de los derivados de polímeros que contienen acetileno de la descripción, un polímero de PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100,000 Da, que porta ya sea un grupo funcional protegido o un agente de terminación de cadena en un extremo y un grupo de salida adecuado en el otro extremo se pone en contacto con un anión de acetileno.

60 Los polímeros solubles en agua pueden enlazarse a los anticuerpos de la presente descripción. Los polímeros solubles en agua pueden enlazarse a través de un aminoácido no codificado naturalmente incorporado en los anticuerpos o cualquier grupo funcional o sustituyente de un aminoácido no codificado naturalmente o codificado de forma natural, o cualquier grupo funcional o sustituyente añadido a un aminoácido no codificado naturalmente o codificado de forma natural. Alternativamente, los polímeros solubles en agua se enlazan a un polipéptido de unión a antígeno incorporando un aminoácido no codificado naturalmente a través de un aminoácido de origen natural (que incluyen pero no se limita a, cisteína, lisina o el grupo amina del residuo N-terminal). En algunos casos, los anticuerpos de la descripción

- comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 aminoácidos no naturales, en donde uno o más aminoácidos no codificados naturalmente se enlazan a polímero(s) soluble(s) en agua (que incluyen pero no se limitan a, PEG y/o oligosacáridos). En algunos casos, los anticuerpos de la descripción comprenden además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más aminoácidos codificados naturalmente unidos a polímeros solubles en agua. En algunos casos, el anticuerpo de la descripción comprende uno o más aminoácidos no codificados naturalmente unidos a polímeros solubles en agua y uno o más aminoácidos de origen natural unidos a polímeros solubles en agua. En algunos ejemplos, los polímeros solubles en agua usados en la presente descripción mejoran la vida media en suero de los anticuerpos con respecto a la forma no conjugada.
- El número de polímeros solubles en agua unidos a un polipéptido de unión a antígeno (es decir, la extensión de la PEGilación o glicosilación) de la presente descripción puede ajustarse para proporcionar una característica farmacológica, farmacocinética o farmacodinámica alterada (que incluye pero no se limita a, aumentada o disminuida) como la vida media *in vivo*. En algunos ejemplos, la vida media del anticuerpo aumenta al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 por ciento, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o al menos aproximadamente 100 veces por encima de un polipéptido no modificado.
- En un ejemplo de la presente descripción, un polipéptido de unión a antígeno que comprende un aminoácido no codificado naturalmente que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene una fracción terminal hidrazina, hidroxilamina, hidrazida o semicarbazida que se enlaza directamente a la cadena principal de PEG.
- En algunos ejemplos, el derivado de PEG con extremo hidroxilamina tendrá la estructura: $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{NH}_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1,000 (es decir, peso molecular promedio está entre 5-40 kDa).
- En algunos ejemplos, el derivado de PEG que contiene hidrazina o hidrazida tendrá la estructura: $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{X}-\text{NH}-\text{NH}_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1,000 y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.
- En algunos ejemplos, el derivado de PEG que contiene semicarbazida tendrá la estructura: $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{NH}_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1,000.
- En otro ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno que comprende un aminoácido que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene una fracción terminal de hidroxilamina, hidrazida, hidrazina, o semicarbazida que se enlaza al esqueleto de PEG por medio de un enlace amida.
- En algunos ejemplos, los derivados de PEG con hidroxilamina terminal tienen la estructura: $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{NH}_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1,000 (es decir, peso molecular promedio está entre 5-40 kDa).
- En algunos ejemplos, los derivados de PEG que contienen hidrazina o hidrazida tienen la estructura: $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-\text{X}-\text{NH}-\text{NH}_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, n es 100-1,000 y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.
- En algunos ejemplos, los derivados de PEG que contienen semicarbazida tienen la estructura: $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{NH}_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1,000.
- En otro ejemplo, un anticuerpo que comprende un aminoácido que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una fracción terminal de hidrazina, hidroxilamina, hidrazida o semicarbazida, donde cada cadena del PEG ramificado tiene un MW en el intervalo de 10-40 kDa y, con mayor preferencia, de 5-20 kDa.
- En otro ejemplo, un anticuerpo que comprende un aminoácido no codificado naturalmente se modifica con un derivado de PEG que tiene una estructura ramificada. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el derivado de PEG con hidrazina o hidrazida terminal tendrá la siguiente estructura: $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})]_2\text{CH}(\text{CH}_2)_m-\text{X}-\text{NH}-\text{NH}_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1,000, y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.
- En algunos ejemplos, los derivados de PEG que contienen un grupo semicarbazida tendrán la estructura: $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_2\text{CH}-\text{X}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{NH}_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), X es opcionalmente NH, O, S, C(O) o no está presente, m es 2-10 y n es 100-1,000.
- En algunos ejemplos, los derivados de PEG que contienen un grupo hidroxilamina tendrán la estructura: $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_2\text{CH}-\text{X}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{NH}_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), X es opcionalmente NH, O, S, C(O) o no está presente, m es 2-10 y n es 100-1,000.

El grado y los sitios en los cuales el (los) polímero(s) soluble(s) en agua se enlazan a los anticuerpos pueden modular la unión de los anticuerpos a un antígeno o receptor.

5 Los métodos y la química para la activación de polímeros así como para la conjugación de péptidos se describen en la literatura y se conocen en la técnica. Los métodos usados comúnmente para la activación de polímeros incluyen, pero no se limitan a, activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepóxidos, epiclorohidrina, divinilsulfona, carbodiimida, sulfonil haluros, triclorotriazina, etc. (ver, R. F. Taylor, (1991), PROTEIN IMMOBILISATION. FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), CHEMISTRY OF
10 PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson y otros, (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N.Y.; Dunn, R. L., y otros, Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

15 Numerosas revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación de PEG están disponibles. Ver, por ejemplo, Harris, Macromol. Chem. Phys. C25 325-373 (1985); Scouten, Methods in Enzymology 135: 30-65 (1987); Wong y otros, Enzyme Microb. Technol. 14: 866-874 (1992); Delgado y otros, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249-304 (1992); Zalipsky, Bioconjugate Chem. 6: 150-165 (1995).

20 Métodos para la activación de polímeros pueden encontrarse además en WO 94/17039, patente de Estados Unidos núm. 5,324,844, WO 94/18247, WO 94/04193, patente de Estados Unidos núm. 5,219,564, patente de Estados Unidos núm. 5,122,614, WO 90/13540, patente de Estados Unidos núm. 5,281,698, y WO 93/15189, y para la conjugación entre polímeros activados y enzimas que incluyen pero no se limitan al Factor de Coagulación VIII (WO 94/15625), hemoglobina (WO 94/09027), molécula portadora de oxígeno (patente de Estados Unidos núm. 4,412,989),
25 ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese y otros, App. Biochem. Biotech. 11: 141-45 (1985)).

La PEGilación (es decir, la adición de cualquier polímero soluble en agua) de polipéptidos de unión a antígeno que contienen un aminoácido no codificado naturalmente, tal como p-azido-L-fenilalanina o un aminoácido que comprende tetrazina, se lleva a cabo por cualquier método conveniente. Por ejemplo, un anticuerpo es PEGilado con un derivado de
30 mPEG terminado en alquino o alqueno tensionado. En resumen, un exceso de mPEG(5000)-O-CH₂-C=CH sólido se añade, con agitación, a una solución acuosa de anticuerpo que contiene p-azido-L-Phe a temperatura ambiente. En otro ejemplo, un exceso de PEG-Y sólido, en donde Y es una fracción que comprende un alqueno tensionado, con agitación, a una solución acuosa de un anticuerpo que comprende un residuo de aminoácido que comprende un grupo funcional tetrazina (tal como un aminoácido no natural descrito en la presente) a temperatura ambiente. Típicamente, la solución
35 acuosa se tampona con un tampón que tiene una pK_a cerca del pH al cual la reacción se lleva a cabo (generalmente aproximadamente pH 4-10). Ejemplos de tampones adecuados para la PEGilación a pH 7.5, por ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, HEPES, fosfato, borato, TRIS-HCl, EPPS, y TES. El pH es continuamente monitoreado y ajustado si fuera necesario. La reacción se deja continuar típicamente durante entre aproximadamente 1-48 horas.

40 Los productos de reacción se someten posteriormente a cromatografía de interacción hidrófoba para separar las variantes de anticuerpo PEGilado de mPEG(5000)-O-CH₂-C=CH libre (o PEG-Y) y cualquier complejo de alto peso molecular del anticuerpo PEGilado que pueda formarse cuando se activa el PEG no bloqueado en ambos extremos de la molécula, reticulando de este modo las moléculas variantes de anticuerpo. Las condiciones durante la cromatografía de interacción hidrofóbica son tales que mPEG(5000)-O-CH₂-C=CH libre (o PEG-Y) fluye a través de la columna,
45 mientras que cualquier complejo de variante del anticuerpo PEGilado reticulado eluye después de las formas deseadas, que contienen una molécula variante de anticuerpo conjugada con uno o más grupos PEG. Las condiciones adecuadas varían dependiendo de los tamaños relativos de los complejos reticulados frente a los conjugados deseados y se determinan fácilmente por los expertos en la técnica. El eluyente que contiene los conjugados deseados se concentra por ultrafiltración y se desalan por diafiltración.

50 Si fuera necesario, los anticuerpos PEGilados obtenidos de la cromatografía hidrofóbica pueden purificarse además por uno o más procedimientos conocidos por los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (usando, pero sin limitarse a, DEAE SEPHAROSE); cromatografía en sílice; HPLC de fase inversa; filtración en gel (usando, pero sin limitarse a SEPHADEX G-75);
55 cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de quelatos metálicos; ultrafiltración/diafiltración; precipitación de etanol; precipitación con sulfato de amonio; cromatografía de enfoque isoelectrico; cromatografía de desplazamiento; procedimientos electroforéticos (que incluyen pero no se limitan a enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (que incluye pero no se limita a la precipitación con sulfato de amonio) o extracción. El peso molecular aparente se puede estimar mediante GPC en comparación con los estándares de proteínas globulares (PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris y Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). La pureza del conjugado anticuerpo-PEG puede evaluarse por degradación proteolítica (que incluye pero no se limita a, escisión por tripsina) seguido por análisis de espectrometría de masas. Pepinsky B., y otros, J. Pharmacol. & Exp. Ther. 297(3):1059-66 (2001).

65 Un polímero soluble en agua enlazado a un aminoácido de un anticuerpo de la descripción puede derivatizarse o sustituirse además sin limitación.

- 5 En otro ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno se modifica con un derivado de PEG que contiene una fracción de azida que reaccionará con una fracción alquino presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado naturalmente. En general, los derivados de PEG tendrán un peso molecular promedio en el intervalo de 1-100 kDa y, en algunos ejemplos, de 10-40 kDa.
- 10 En algunos ejemplos, el derivado de PEG azida-terminal tendrá la estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-N_3$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1,000 (es decir, el peso molecular promedio está entre 5-40 kDa).
- 15 En otro ejemplo, el derivado de PEG azida-terminal tendrá la estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-N_3$, donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1,000 (es decir, el peso molecular promedio está entre 5-40 kDa).
- 20 En algunos ejemplos, el derivado de PEG con terminal alqueno tensionado tendrá la estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-Y$ donde Y es una fracción que comprende un alqueno tensionado, R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1,000 (es decir, el peso molecular promedio está entre 5-40 kDa).
- 25 En otro ejemplo, el derivado de PEG con terminal alqueno tensionado tendrá la estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-Y$, donde Y es una fracción que comprende un alqueno tensionado, R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1,000 (es decir, el peso molecular promedio está entre 5-40 kDa).
- 30 En otro ejemplo, un anticuerpo que comprende un aminoácido que contiene alquino se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una fracción azida terminal, donde cada cadena del PEG ramificado tiene un MW en el intervalo de 10-40 kDa y, con mayor preferencia, de 5-20 kDa. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el derivado de PEG con azida terminal tendrá la siguiente estructura: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_p-N_3$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10, y n es 100-1,000, y X es opcionalmente un grupo O, N, S o carbonilo (C=O), en cada caso que puede estar presente o ausente.
- 35 En otro ejemplo, un anticuerpo que comprende un aminoácido que contiene tetrazina se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una fracción alqueno tensionado terminal, donde cada cadena del PEG ramificado tiene un PM en el intervalo de 10-40 kDa y, con mayor preferencia, de 5-20 kDa. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el derivado de PEG con alqueno tensionado terminal tendrá la siguiente estructura: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_p-Y$, donde Y es una fracción que comprende un alqueno tensionado, R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10, y n es 100-1,000, y X es opcionalmente un O, N, S o grupo carbonilo (C=O), en cada caso que puede estar presente o ausente.
- 40 En otro ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno se modifica con un derivado de PEG que contiene una fracción alquino que reaccionará con una fracción de azida presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado naturalmente.
- 45 En algunos ejemplos, el derivado de PEG con alquino terminal tendrá la siguiente estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-C=CH$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1,000 (es decir, el peso molecular promedio está entre 5-40 kDa).
- 50 En otro ejemplo, un anticuerpo que comprende un aminoácido no codificado naturalmente que contiene alquino se modifica con un derivado de PEG que contiene un terminal azida o fracción alquino terminal que se enlaza a la cadena principal de PEG por medio de un enlace amida.
- 55 En algunos ejemplos, el derivado de PEG alquino-terminal tendrá la siguiente estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-C=CH$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1,000.
- 60 En otro ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno que comprende un aminoácido que contiene azida se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una fracción terminal alquino, y cada cadena del PEG ramificado tiene un PM en el intervalo de 10-40 kDa y, con mayor preferencia, de 5-20 kDa. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el derivado de PEG alquino-terminal tendrá la siguiente estructura: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_p-C=CH$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10, y n es 100-1,000, y X es opcionalmente un O, N, S o grupo carbonilo (C=O), o no está presente.
- 65 En otro ejemplo, un anticuerpo se modifica con un derivado de PEG que contiene un grupo funcional activado (que incluye pero no se limita a, éster, carbonato) que comprende además un grupo aril fosfina que reaccionará con una fracción de azida presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado naturalmente. En general, los derivados de PEG tendrán un peso molecular promedio en el intervalo de 1-100 kDa y, en algunos ejemplos, de 10-40 kDa.
- Otras moléculas de PEG ilustrativas que pueden enlazarse a los anticuerpos, así como métodos de PEGilación incluyen los descritos en, por ejemplo, la publicación de las patentes de Estados Unidos núms. 2004/0001838; 2002/0052009;

2003/0162949; 2004/0013637; 2003/0228274; 2003/0220447; 2003/0158333; 2003/0143596; 2003/0114647; 2003/0105275; 2003/0105224; 2003/0023023; 2002/0156047; 2002/0099133; 2002/0086939; 2002/0082345; 2002/0072573; 2002/0052430; 2002/0040076; 2002/0037949; 2002/0002250; 2001/0056171; 2001/0044526; 2001/0027217; 2001/0021763; 1
 5 as patentes de Estados Unidos núms. 6,646,110; 5,824,778; 5,476,653; 5,219,564; 5,629,384; 5,736,625; 4,902,502; 5,281,698; 5,122,614; 5,473,034; 5,516,673; 5,382,657; 6,552,167; 6,610,281; 6,515,100; 6,461,603; 6,436,386; 6,214,966; 5,990,237; 5,900,461; 5,739,208; 5,672,662; 5,446,090; 5,808,096; 5,612,460; 5,324,844; 5,252,714; 6,420,339; 6,201,072; 6,451,346; 6,306,821; 5,559,213; 5,612,460; 5,747,646; 5,834,594; 5,849,860; 5,980,948; 6,004,573; 6,129,912; WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131., WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 y EP 154 316. Cualquiera de las moléculas de PEG
 10 descritas en la presente pueden usarse en cualquier forma, que incluye pero no se limita a, cadena sencilla, cadena ramificada, cadena multibrazos, funcional simple, bifuncional, multifuncional, o cualquier combinación de estas.

15 En ciertos ejemplos, los anticuerpos pueden enlazarse a las cargas con uno o más enlazadores capaces de reaccionar con el aminoácido no natural. El uno o más enlazadores pueden ser cualquier enlazador evidente para los expertos en la técnica. El término "enlazador" se usa en la presente para referirse a grupos o enlaces que normalmente se forman como resultado de una reacción química y generalmente son enlaces covalentes. Enlaces hidrolíticamente estables
 20 significa que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con el agua a valores de pH útiles, que incluyen, pero no se limitan a, en condiciones fisiológicas durante un período de tiempo prolongado, quizás incluso indefinidamente. Enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significan que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, que incluyen, por ejemplo, sangre. Enlaces enzimáticamente inestables o degradables significan que el enlace puede ser degradado por una o más enzimas. Como se entiende en la técnica, el PEG y los polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en la cadena principal del polímero o en el grupo enlazador
 25 entre la cadena principal del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula del polímero. Por ejemplo, los enlaces éster formados por la reacción de ácidos carboxílicos PEG o ácidos carboxílicos PEG activados con grupos alcohol en un agente biológicamente activo generalmente se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, pero no se limitan a, enlaces de carbonato; enlaces de imina que resultan de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces éster de fosfato formados haciendo reaccionar un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que son producto de la reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que son el producto de reacción de un aldehído y un alcohol; enlaces de ortoéster que son el producto de reacción de un formiato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, que incluyen, pero no se limitan a, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosforamido, que incluyen, pero no se limitan a, al final de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido. Los enlazadores ramificados pueden usarse en anticuerpos de la descripción. Los expertos en la técnica conocen una serie de enlazadores escindibles diferentes. Ver las patentes de Estados Unidos
 35 núms. 4,618,492; 4,542,225, y 4,625,014. Los mecanismos para la liberación de un agente de estos grupos enlazadores incluyen, por ejemplo, la irradiación de un enlace fotolábil y la hidrólisis catalizada por ácido. La patente de Estados Unidos núm. 4,671,958, por ejemplo, incluye una descripción de inmunocombinados que comprenden enlazadores que se escinden en el sitio objetivo *in vivo* por las enzimas proteolíticas del sistema del complemento del paciente. La longitud del enlazador puede predeterminarse o seleccionarse dependiendo de una relación espacial deseada entre el anticuerpo y la molécula unida a él. En vista del gran número de métodos que se han informado para enlazar una variedad de compuestos de radiodiagnóstico, compuestos radioterapéuticos, fármacos, toxinas y otros agentes a anticuerpos, un experto en la técnica podrá determinar un método adecuado para enlazar un agente dado a un anticuerpo.

40 Cualquier enlazador hetero- u homo-bifuncional pueden usarse para enlazar los conjugados. El enlazador puede tener un rango amplio de peso molecular o longitud molecular. Los enlazadores de peso molecular más grandes o más pequeños pueden usarse para proporcionar una relación o conformación espacial deseada entre el anticuerpo y la entidad unida. Los enlazadores que tienen una longitud molecular más larga o más corta también pueden usarse para proporcionar un espacio deseado o flexibilidad entre el anticuerpo y la entidad vinculada. De manera similar, un enlazador que tiene una forma o conformación particular puede usarse para impartir una forma o conformación particular al anticuerpo o a la entidad unida, ya sea antes o después de que el anticuerpo alcance su objetivo. Los
 55 grupos funcionales presentes en cada extremo del enlazador pueden seleccionarse para modular la liberación de un anticuerpo o una carga bajo condiciones deseadas. Esta optimización de la relación espacial entre el anticuerpo y la entidad unida puede proporcionar nuevas propiedades moduladas o deseadas a la molécula.

60 Algunos ejemplos proporcionan enlazadores bifuncionales solubles en agua que tienen una estructura de mancuerna que incluye: a) una azida, un alquino, una hidrazina, una hidrazida, una hidroxilamina, un carbonilo, una tetrazina, o una fracción que contiene alqueno tensionado en al menos un primer extremo de una cadena principal del polímero; y b) al menos un segundo grupo funcional en un segundo extremo de la cadena principal del polímero. El segundo grupo funcional puede ser el mismo o diferente que el primer grupo funcional. El segundo grupo funcional, en algunos ejemplos, no reacciona con el primer grupo funcional. En algunos ejemplos se proporcionan compuestos solubles en agua que comprenden al menos un brazo de una estructura molecular ramificada. Por ejemplo, la estructura molecular ramificada puede ser dendrítica.

Otros enlazadores ilustrativos incluyen, por ejemplo, malC, tioéter, AcBut, péptido valina-citrulina, péptido malC-valina-citrulina, hidrazona, y disulfuro. Estos y otros enlazadores ilustrativos se describen en mayor detalle en Gerber y otros, Nat. Prod. Rep., 2013, 30:625-639.

5

Otras cargas ilustrativas incluyen, por ejemplo, NAc- γ -caliqueamicina-SH, ansamitosisina P-3, dolastatinas 10 y 15, caliqueamicina- γ , CC-1065/duocarmicina, halicondrina B, hemiasterlina, y dictiostatina. Estas y otras cargas ilustrativas se describen en mayor detalle en Gerber y otros, Nat. Prod. Rep., 2013, 30:625-639.

10 Anticuerpos parentales

El anticuerpo parental puede ser cualquier anticuerpo conocido por los expertos en la técnica, o descubierto después, sin limitación. El anticuerpo parental puede ser sustancialmente codificado por un gen de anticuerpo o genes de anticuerpos de cualquier organismo, que incluyen pero no se limitan a humanos, ratones, ratas, conejos, camellos, llamas, dromedarios, monos, particularmente mamíferos y particularmente humanos y particularmente ratones y ratas. En un ejemplo, el anticuerpo parental puede ser completamente humano, obtenido por ejemplo a partir de un paciente o sujeto, usando ratones u otros animales transgénicos (Bruggemann y Taussig, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-458) genotecas de anticuerpos humanos combinadas con métodos de selección (Griffiths y Duncan, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:102-108). El anticuerpo parental puede ser de cualquier fuente, incluyendo la artificial o de origen natural. Por ejemplo el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo modificado, que incluye pero no se limita a anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados (Clark, 2000, Immunol. Today 21:397-402) o derivado de una genoteca combinatoria. Además, el anticuerpo parental puede ser una variante modificada de un anticuerpo que es sustancialmente codificado por uno o más genes de anticuerpos naturales. Por ejemplo, en un ejemplo el anticuerpo parental es un anticuerpo que ha sido identificado por maduración de la afinidad.

25

El anticuerpo parental puede tener afinidad para cualquier antígeno conocido por los expertos en la técnica, o descubierto posteriormente. Virtualmente cualquier sustancia puede ser un antígeno para un anticuerpo parental, o un anticuerpo de la presente descripción. Ejemplos de antígenos útiles incluyen, pero no se limitan a, antitripsina alfa-1, angiostatina, factor antihemolítico, anticuerpos, apolipoproteína, apoproteína, factor natriurético atrial, polipéptido natriurético atrial, péptido atrial, quimocinas C-X-C (*p. ej.*, T39765, NAP-2, ENA-78, Gro-a, Gro-b, Gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG), calcitonina, quimocinas CC (*p. ej.*, proteína 1 quimioatrayente de monocitos, proteína 2 quimioatrayente de monocitos, proteína 3 quimioatrayente de monocitos, proteína 1 alfa inflamatoria de monocitos, proteína 1 beta inflamatoria de monocito, RANTES, I309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262), ligando CD40, ligando C-kit, colágeno, factor estimulante de colonias (CSF), factor 5a del complemento, inhibidor del complemento, receptor 1 del complemento, citocinas, (*p. ej.*, péptido 78 activador de neutrófilos epiteliales, GRO/MGSA, GRO, GRO, MIP-1, MIP-1, MCP-1), factor de crecimiento epidérmico (EGF), eritropoyetina ("EPO"), toxinas exfoliantes A y B, factor IX, factor VII, factor VIII, factor X, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), fibrinógeno, fibronectina, G-CSF, GM-CSF, glucocerebrosidasa, gonadotropina, factores de crecimiento, proteínas hedgehog (*p. ej.*, Sonic, Indian, Desert), hemoglobina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), hirudina, albúmina sérica humana, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), interferones (*p. ej.*, IFN- α , IFN-, IFN- γ), interleucinas (*p. ej.*, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, etc.), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), lactoferrina, factor inhibidor de leucemia, luciferasa, neurturina, factor inhibidor de neutrófilos (NIF), oncostatina M, proteína osteogénica, hormona paratiroide, PD-ECSF, PDGF, hormonas peptídicas (*p. ej.*, hormona de crecimiento humana), pleiotropina, proteína A, proteína G, exotoxinas pirogénicas A, B, y C, relaxina, renina, SCF, receptor del complemento soluble I, I-CAM 1 soluble, receptores de interleucinas solubles (IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15), receptor de TNF soluble, somatomedina, somatostatina, somatotropina, estreptocinasa, superantígenos, es decir, enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE), superóxido dismutasa, toxina del síndrome de shock tóxico (TSST-1), timosina alfa 1, activador tisular del plasminógeno, factor de necrosis tumoral (TNF β), receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), urocinasa y otros. Estos antígenos pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, a partir de fuentes comerciales o a partir de polipéptidos publicados o secuencias de polinucleótidos (por ejemplo del Genbank).

50

Los antígenos adicionales incluyen, pero no se limitan a, activadores transcripcionales y de expresión. Los activadores transcripcionales y de expresión ilustrativos incluyen genes y proteínas que modulan el crecimiento celular, la diferenciación, la regulación o similares. Los activadores transcripcionales y de expresión se encuentran en procariontes, virus y eucariotas, incluidos hongos, plantas y animales, incluidos los mamíferos, que proporcionan una amplia gama de objetivos terapéuticos. Se apreciará que los activadores transcripcionales y de expresión regulan la transcripción por muchos mecanismos, por ejemplo, uniéndose a receptores, estimulando una cascada de transducción de señales, regulando la expresión de factores de transcripción, uniéndose a promotores y potenciadores, uniéndose a proteínas que se unen a promotores y potenciadores, desenrollando ADN, empalmado pre-ARNm, poliadenilando ARN y degradando ARN. Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, activadores de expresión tales como citocinas, moléculas inflamatorias, factores de crecimiento, sus receptores, y productos de oncogenes, por ejemplo, interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-8, etc.), interferones, FGF, IGF-I, IGF-II, FGF, PDGF, TNF, TGF- α , TGF- β , EGF, SCF/c-Kit, CD40L/CD40, VLA-4VCAM-1, ICAM-1/LFA-1, e hialurina/CD44; moléculas de transducción de señales y productos de oncogenes correspondientes, por ejemplo, Mos, Ras, Raf, y Met; y activadores y supresores transcripcionales, por

60

65

ejemplo, p53, Tat, Fos, Myc, Jun, Myb, Rel, y receptores de hormonas esteroideas tales como aquellos para estrógeno, progesterona, testosterona, aldosterona, el ligando receptor de LDL y corticosterona.

5 Las proteínas de las vacunas pueden ser antígenos que incluyen, pero no se limitan a, proteínas de hongos infecciosos, por ejemplo, especies de *Aspergillus*, *Candida*; bacterias, particularmente *E. coli*, que sirve como modelo de bacteria patógena, así como bacterias médicamente importantes tales como Estafilococos (por ejemplo, aureus), o Estreptococos (por ejemplo, *pneumoniae*); protozoos tales como esporozoos (por ejemplo, Plasmodia), rizopodos (por ejemplo, *Entamoeba*) y flagelados (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Trichomonas*, *Giardia*, etc.); virus tales como (+) ARN virus (ejemplos incluyen Poxvirus por ejemplo, vaccinia; Picornavirus, por ejemplo polio; Togavirus, por ejemplo, rubella; 10 Flavivirus, por ejemplo, HCV; y Coronavirus), (-)virus de ARN (por ejemplo, Rhabdovirus, por ejemplo, VSV; Paramyxovirus, por ejemplo, RSV; Orthomyxovirus, p. ej., influenza; Bunyavirus; y Arenavirus), virus de dsDNA (Reovirus, por ejemplo), virus de RNA a DNA, es decir, Retrovirus, por ejemplo, HIV y HTLV, y algunos virus de DNA a RNA tal como el de la Hepatitis B.

15 Los antígenos pueden ser enzimas que incluyen, pero no se limitan a, amidasas, aminoácido racemasas, acilasas, dehalogenasas, dioxigenasas, diarilpropano peroxidadas, epimerasas, epóxido hidrolasas, esteradas, isomeradas, cinasas, glucosa isomeradas, glicosidasas, glicosil transferasas, haloperoxidasas, monooxigenasas (por ejemplo, p450s), lipasas, lignina peroxidadas, nitrilo hidratadas, nitrilasas, proteasas, fosfatadas, subtilisinas, transaminasa, y nucleasas.

20 Las proteínas relacionadas con la agricultura tales como proteínas de resistencia a insectos (por ejemplo, las proteínas Cry), enzimas de producción de almidón y lípidos, toxinas de plantas e insectos, proteínas de resistencia a toxinas, proteínas de desintoxicación de micotoxinas, enzimas de crecimiento de plantas (por ejemplo, Ribulosa 1,5-Bisfosfato Carboxilasa / Oxigenasa, "RUBISCO"), lipoxigenasa (LOX) y fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa también pueden ser antígenos.

25 Por ejemplo, el antígeno puede ser una molécula asociada a la enfermedad, tales como antígeno de superficie tumoral tal como idiotipos de células B, CD20 en células B malignas, CD33 en blastos leucémicos, y HER2/neu en cáncer de mama. Alternativamente, el antígeno puede ser un receptor del factor de crecimiento. Ejemplos de los factores del crecimiento incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento epidérmico (EGF), transferrina, factor de crecimiento tipo insulina, factores de crecimiento transformantes (TGF), interleucina-1, e interleucina-2. Por ejemplo, se ha encontrado una alta expresión de receptores de EGF en una amplia variedad de tumores primarios epiteliales humanos. Se ha descubierto que el TGF- α media una vía de estimulación autocrina en células cancerosas. Se ha demostrado que 30 varios anticuerpos monoclonales murinos pueden unirse a receptores de EGF, bloquear la unión del ligando a los receptores de EGF e inhibir la proliferación de una variedad de líneas de células cancerosas humanas en cultivo y en modelos de xenoinjerto. Mendelsohn y Baselga (1995) Antibodies to growth factors and receptors, in Biologic Therapy of Cancer, 2da Ed., J B Lippincott, Filadelfia, págs. 607-623. Así, los anticuerpos de la presente descripción pueden usarse para tratar una variedad de cánceres.

40 El antígeno también puede ser una proteína o un receptor de la superficie celular asociado con la enfermedad arterial coronaria tal como el receptor de glicoproteína IIb/IIIa de plaquetas, enfermedades autoinmunes tales como CD4, CAMPATH-1 y región de lípido A del lipopolisacárido bacteriano gram-negativo. Los anticuerpos humanizados contra CD4 se han probado en pruebas clínicas en el tratamiento de pacientes con micosis fungoides, psoriasis pustular generalizada, psoriasis severa, y artritis reumatoide. Los anticuerpos contra la región de lípido A del lipopolisacárido 45 bacteriano gram-negativo se han probado clínicamente en el tratamiento de choque séptico. Los anticuerpos contra CAMPATH-1 se han probado también clínicamente en el tratamiento contra la artritis reumatoide refractaria. Así, los anticuerpos proporcionados en la presente pueden usarse para tratar una variedad de enfermedades autoinmunes.

50 Los antígenos útiles también incluyen proteínas o péptidos asociados con enfermedades alérgicas humanas, tales como proteínas mediadoras de la inflamación, por ejemplo interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF), receptor de leucotrieno y 5-lipoxigenasa, y moléculas de adhesión tal como V-CAM/VLA-4. Además, la IgE también puede servir como antígeno porque la IgE desempeña un papel fundamental en las reacciones alérgicas hipersensibles inmediatas de tipo I, como el asma. Los estudios han demostrado que el nivel de IgE sérica total tiende a correlacionarse con la gravedad de las enfermedades, especialmente en el asma. Burrows y otros (1989) "Association of asthma with serum 55 IgE levels and skin-test reactivity to allergens" New Engl. L. Med. 320:271-277. Así, los anticuerpos seleccionados contra IgE pueden usarse para reducir el nivel de IgE o bloquear la unión de IgE a mastocitos y basófilos en el tratamiento de enfermedades alérgicas sin que tenga impacto sustancial en funciones inmunes normales.

60 El antígeno también puede ser una proteína viral o de núcleo que puede servir como un antígeno para desencadenar la respuesta inmune del huésped infectado. Ejemplos de estas proteínas virales incluyen, pero no se limitan a, glicoproteínas (o antígenos de superficie, por ejemplo, GP120 y GP41) y proteínas de la cápsida (o proteínas estructurales, por ejemplo, proteína P24); antígenos de superficie o proteínas centrales del virus de la hepatitis A, B, C, D o E (por ejemplo antígeno pequeño de superficie de la hepatitis B (SHBsAg) del virus de la hepatitis B y las proteínas del núcleo del virus de la hepatitis C, antígenos NS3, NS4 y NS5); glicoproteína (proteína G) o la proteína de fusión 65 (proteína F) del virus sincitial respiratorio (VSR); proteínas del núcleo y de superficie del virus del herpes simple HSV-1 y HSV-2 (por ejemplo, glicoproteína D de HSV-2).

El antígeno también puede ser un producto génico supresor tumoral mutado que ha perdido su función supresora de tumores y puede hacer que las células sean más susceptibles al cáncer. Los genes supresores de tumores son genes que funcionan para inhibir el crecimiento celular y los ciclos de división, lo que previene el desarrollo de la neoplasia.

5 Las mutaciones en genes supresores de tumores hacen que la célula ignore uno o más de los componentes de la red de señales inhibitorias, superando los puntos de control del ciclo celular y dando como resultado una mayor tasa de crecimiento celular controlado en el cáncer. Ejemplos de genes supresores de tumores incluyen, pero no se limitan a, DPC-4, NF-1, NF-2, RB, p53, WT1, BRCA1 y BRCA2. DPC-4 está involucrado en cáncer de páncreas y participa en una vía citoplásmica que inhibe la división celular. NF-1 codifica una proteína que inhibe a Ras, una proteína inhibidora del citoplasma.

10 NF-1 está involucrado en el neurofibroma y feocromocitomas del sistema nervioso y leucemia mieloide. NF-2 codifica una proteína nuclear que está involucrada en el meningioma, schwannoma y ependimoma del sistema nervioso. RB codifica para la proteína pRB, una proteína nuclear que es un importante inhibidor del ciclo celular. RB está involucrado en el retinoblastoma así como también cáncer de huesos, vejiga, cáncer de pulmón de células pequeñas y de mama. El p53 codifica para la proteína p53 que regula la división celular y puede inducir la apoptosis. La mutación y/o inactivación de p53 se encuentra en una amplia gama de cánceres. WT1 está involucrado en el tumor de Wilms de los riñones. BRCA1 está involucrado en el cáncer de mama y de ovario, y BRCA2 está involucrado en el cáncer de mama. Así, los anticuerpos se pueden usar para bloquear las interacciones del producto génico con otras proteínas o compuestos bioquímicos en las vías de inicio y desarrollo del tumor.

20 El antígeno puede ser una molécula CD que incluye pero no se limita a, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8α, CD8β, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45R, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CDw70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD79α, CD79β, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD 101, CD 102, CD 103, CD 104, CD 105, CD 106, CD 107a, CD 107b, CDw108, CDw109, CD110-113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CDw124, CD125, CD126, CDw127, CDw128a, CDw128b, CD129, CDw130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CDw149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, y TCRζ. El antígeno puede ser VEGF, receptor del VEGF, EGFR, Her2, TNFα, receptor de TNFR1, GPIIb/IIIa, cadena IL-2Rα, cadena IL-2Rβ, proteína RSV F, integrina alfa-4, IgE, receptor de IgE, digoxina, veneno de la víbora alfombra, complemento C5, OPGL, antígeno tumoral CA-125, proteínas de *Staphylococcus epidermidis*, proteínas de *Staphylococcus aureus*, proteínas involucradas en la infección estafilocócica (que incluyen pero no se limitan a, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*), receptor de IL-6, CTLA-4, RSV, subunidad Tac del receptor de IL-2, IL-5, y EpCam. El antígeno puede ser un fragmento de una molécula.

40 Los anticuerpos parentales pueden ser cualquier anticuerpo conocido en la técnica o cualquier anticuerpo descubierto o desarrollado por los expertos en la técnica sin limitación. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a anticuerpo anti-TNF (patente de los Estados Unidos núm. 6,258,562), anti-IL-12 y/o anticuerpo anti-IL-12p40 (patente de los Estados Unidos núm. 6,914,128); anticuerpo anti-IL-18 (publicación de la patente de los Estados Unidos núm. 2005/0147610), anti-05, anti-CBL, anti-CD147, anti-gp120, anti-VLA-4, anti-CD11a, anti-CD18, anti-VEGF, anti-CD40L, anti CD-40 (por ejemplo, ver la publicación del PCT núm. WO 2007/124299) anti-Id, anti-ICAM-1, anti-CXCL13, anti-CD2, anti-EGFR, anti-TGF-β 2, anti-HGF, anti-cMet, anti-DLL-4, anti-NPR1, anti-PLGF, anti-ErbB3, anti-E-selectina, anti-Factor VII, anti-Her2/neu, anti-F gp, anti-CD11/18, anti-CD14, anti-ICAM-3, anti-RON, anti-SOST, anti CD-19, anti-CD80 (por ejemplo, ver la publicación del PCT núm. WO 2003/039486, anti-CD4, anti-CD3, anti-CD23, anti-β2-integrina, anti-α4β7, anti-CD52, anti-HLA DR, anti-CD22 (por ejemplo, ver la patente de Estados Unidos núm. 5,789,554), anti-CD20, anti-MIF, anti-CD64 (FcR), anti-TCR α y/o β, anti-CD2, anti-Hep B, anti-CA 125, anti-EpCAM, anti-gp120, anti-CMV, anti-gpIIb/IIIa, anti-IgE, anti-CD25, anti-CD33, anti-HLA, anti-IGF1,2, anti-IGFR, anti-VNRIintegrina, anti-IL-1α, anti-IL-1β, anti-receptor de IL-1, anti-receptor de IL-2, anti-IL-4, anti-receptor de IL-4, anti-IL5, anti-receptor de IL-5, anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-9, anti-IL-13, anti-receptor de IL-13, anti-IL-17, anti-IL-6R, anti-RANKL, anti-NGF, anti-DKK, anti-αVβ3, anti-IL-17A, anti-IL23p19 y anti-IL-23 (ver Presta, L. G. (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116: 731-6).

Los anticuerpos parentales pueden también seleccionarse de varios anticuerpos terapéuticos aprobados para su uso, en pruebas clínicas, o en desarrollo para uso clínico. Tales anticuerpos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, rituximab (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,736,137), un anticuerpo anti-CD20 quimérico aprobado para tratar Linfoma no Hodgkin; HuMax-CD20, un anti-CD20 desarrollado actualmente por Genmab, un anticuerpo anti-CD20 descrito en la patente de Estados Unidos núm. 5,500,362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel), y PRO70769 (solicitud PCT. WO 2004/056312 A2), trastuzumab (Herceptin®, Genentech) (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,677,171), un anticuerpo humanizado anti-Her2/neu aprobado para tratar cáncer de mama; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg®), desarrollado actualmente por Genentech; un anticuerpo anti-Her2 patente de los Estados Unidos núm. 4,753,894; cetuximab (Erbix®, Imclone) (patente de Estados Unidos núm. 4,943,533; publicación del PCT núm. WO

96/40210), un anticuerpo anti-EGFR quimérico en pruebas clínicas para una variedad de cánceres; ABX-EGF (patente de Estados Unidos núm. 6,235,883), desarrollado actualmente por Abgenix-Immunex-Amgen; HuMax-EGFr (patente de Estados Unidos núm. 7,247,301), desarrollado actualmente por Genmab; 425, EMD55900, EMD62000, y EMD72000 (Merck KGaA) (patente de Estados Unidos núm. 5,558,864; Murthy, y otros (1987) Arch. Biochem. Biophys. 252(2): 549-60; Rodeck, y otros (1987) J. Cell. Biochem. 35(4): 315-20; Kettleborough, y otros (1991) Protein Eng. 4(7): 773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (publicación del PCT núm. WO 95/20045; Modjtahedi, y otros (1993) J. Cell. Biophys. 22(I-3): 129-46; Modjtahedi, y otros (1993) Br. J. Cancer 67(2): 247-53; Modjtahedi, y otros (1996) Br. J. Cancer 73(2): 228-35; Modjtahedi, y otros (2003) Int. J. Cancer 105(2): 273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canadá y Centro de Inmunología Molecular, Cuba (patentes de Estados Unidos núm. 5,891,996; patente de Estados Unidos núm. 6,506,883; Mateo, y otros (1997) Immunotechnol. 3(1): 71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth, y otros (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100(2): 639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (publicación del PCT núm. WO 01/62931A2); y SC100 (Scancell) (publicación del PCT núm. WO 01/88138); alemtuzumab (Campath®, Millenium), un mAb humanizado aprobado recientemente para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de células B; muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Ortho Biotech/Johnson & Johnson, ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), un anticuerpo anti-CD20 desarrollado por IDEC/Schering AG, gemtuzumab ozogamicin (Milotarg®), un anticuerpo anti-CD33 (proteína p67) desarrollado por Celltech/Wyeth, alefacept (Amevive®), una fusión de anti-LFA-3 Fc desarrollada por Biogen), abciximab (ReoPro®), desarrollado por Centocor/Lilly, basiliximab (Simulect®), desarrollado por Novartis, palivizumab (Synagis®), desarrollado por Medimmune, infliximab (Remicade®), un anticuerpo anti-TNF α desarrollado por Centocor, adalimumab (Humira®), un anticuerpo anti-TNF α desarrollado por Abbott, Humicade®, un anticuerpo anti-TNF α desarrollado por Celltech, golimumab (CNTO-148), un anticuerpo para TNF totalmente humano desarrollado por Centocor, etanercept (Enbrel®), una fusión de p75 receptor de TNF Fc desarrollado por Immunex/Amgen, lenercept, una fusión del receptor de p55TNF Fc previamente desarrollado por Roche, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 desarrollado por Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 que se desarrolla por Abgenix, ABX-MA1, un anticuerpo anti-MUC18 que se desarrolla por Abgenix, Pentumomab (R1549, 90Y-muHMFG1), un anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, Therex (R1550), un anticuerpo anti-MUC1 que se desarrolla por Antisoma, AngioMab (AS1405), que se desarrolla por Antisoma, HuBC-1, que se desarrolla por Antisoma, Thioplatin (AS 1407) que se desarrolla por Antisoma, Antegren® (natalizumab), un anticuerpo anti- α -4- β -1 (VLA-4) y α -4- β -7 que se desarrolla por Biogen, mAb VLA-1, un anticuerpo anti-VLA-1 integrina que se desarrolla por Biogen, mAb LTBR, un anticuerpo anti-receptor de linfotóxina beta (LTBR) que se desarrolla por Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGF- β que se desarrolla por Cambridge Antibody Technology, ABT 874 (J695), un anticuerpo anti-IL-12 p40 que se desarrolla por Abbott, CAT-192, un anticuerpo anti-TGF β 1 que se desarrolla por Cambridge Antibody Technology y Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxin1 que se desarrolla por Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B® un anticuerpo anti-Blys que se desarrolla por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences Inc., mAb TRAIL-R1, un anticuerpo anti-TRAIL-R1 que se desarrolla por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences, Inc., Avastin® bevacizumab, rhuMab-VEGF), un anticuerpo anti-VEGF que se desarrolla por Genentech, un anticuerpo contra la familia de receptores de HER que se desarrolla por Genentech, Anti-Tissue Factor (ATF), un anticuerpo anti-Factor Tisular que se desarrolla por Genentech, Xolair® (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE que se desarrolla por Genentech, Raptiva® (Efalizumab), un anticuerpo anti-CD11a que se desarrolla por Genentech y Xoma, anticuerpo mIN-02 (anteriormente LDP-02), que se desarrolla por Genentech y Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 que se desarrolla por Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que se desarrolla por Genmab y Amgen, HuMax-Inflam, que se desarrolla por Genmab y Medarex, HuMax-Cancer, un anticuerpo anti-Heparanasa I que se desarrolla por Genmab y Medarex y Oxford GcoSciences, HuMax-Lymphoma, que se desarrolla por Genmab y Amgen, HuMax-TAC, que se desarrolla por Genmab, IDEC-131, y anticuerpo anti-CD40L que se desarrolla por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 que se desarrolla por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 que se desarrolla por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, un anti-CD 23 que se desarrolla por IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos anti-factor de migración de macrófagos (MIF) que se desarrollan por IDEC Pharmaceuticals, BEC2, un anticuerpo anti-idiotípico que se desarrolla por Imclone, IMC-1C11, un anticuerpo anti-KDR que se desarrolla por Imclone, DC101, un anticuerpo anti-flk-1 que se desarrolla por Imclone, anticuerpos anti-VE cadherina que se desarrollan por Imclone, CEA-Cide® (labetuzumab), un anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) que se desarrolla por Immunomedics, LymphoCide® (Epratuzumab), un anticuerpo anti-CD22 que se desarrolla por Immunomedics, AFP-Cide, que se desarrolla por Immunomedics, MyelomaCide, que se desarrolla por Immunomedics, LkoCide, que se desarrolla por Immunomedics, ProstaCide, que se desarrolla por Immunomedics, MDX-010, un anticuerpo anti-CTLA4 que se desarrolla por Medarex, MDX-060, un anticuerpo anti-CD30 que se desarrolla por Medarex, MDX-070 que se desarrolla por Medarex, MDX-018 que se desarrolla por Medarex, Osidem® (IDM-1), y anticuerpo anti-Her2 que se desarrolla por Medarex y Immuno-Designed Molecules, HuMax-CD4, un anticuerpo anti-CD4 que se desarrolla por Medarex y Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que se desarrolla por Medarex y Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNF α que se desarrolla por Medarex y Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citocina que se desarrolla por Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpos anti-molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (CD54) que se desarrolla por MorphoSys, MOR201, un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR-3) que se desarrolla por MorphoSys, Nuvion® (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 que se desarrolla por Protein Design Labs, HuZAF®, un anticuerpo anti-interferón gamma que se desarrolla por Protein Design Labs, anti- α 5 β 1 Integrina, que se desarrolla por Protein Design Labs, anti-IL-12, que se desarrolla por Protein Design Labs, ING-1, un anticuerpo anti-EpCAM que se desarrolla por Xoma, Xolair® (Omalizumab) un anticuerpo humanizado anti-IgE desarrollado por Genentech y Novartis, y mIN01, un anticuerpo anti- β 2 integrina que se desarrolla por Xoma. En otro ejemplo, los agentes terapéuticos incluyen KRN330 (Kirin); anticuerpo huA33 (A33, Ludwig

Institute for Cancer Research); CNTO 95 (alfa V integrinas, Centocor); MEDI-522 (α V β 3 integrina, Medimmune); volociximab (α V β 1 integrina, Biogen/PDL); mAb humano 216 (epítipo glicosilado de células B, NCI); BiTE MT103 (CD19 \times CD3 bispecífico, Medimmune); 4G7xH22 (célula B \times Fc γ R1 bispecífico, Medarex/Merck KGa); rM28 (CD28 \times MAPG bispecífico, patente EP núm. EP1444268); MDX447 (EMD 82633) (CD64 \times EGFR bispecífico, Medarex); Catumaxomab (removab) (EpcAMx anti-CD3 bispecífico, Trion/Fres); Ertumaxomab (HER2/CD3 bispecífico, Fresenius Biotech); oregovomab (OvaRex) (CA-125, ViRex); Rencarex® (WX G250) (anhidrasa carbónica IX, Willex); CNTO 888 (CCL2, Centocor); TRC105 (CD105 (endoglina, Tracon); BMS-663513 (agonista de CD137, Bristol Myers Squibb); MDX-1342 (CD19, Medarex); Siplizumab (MEDI-507) (CD2, Medimmune); Ofatumumab (Humax-CD20) (CD20, Genmab); Rituximab (Rituxan) (CD20, Genentech); veltuzumab (hA20) (CD20, Immunomedics); Epratuzumab (CD22, Amgen); lumiliximab (IDEC 152) (CD23, Biogen); muromonab-CD3 (CD3, Ortho); HuM291 (receptor fc CD3, PDL Biopharma); HeFi-1, CD30, NCI); MDX-060 (CD30, Medarex); MDX-1401 (CD30, Medarex); SGN-30 (CD30, Seattle Genentech); SGN-33 (Lintuzumab) (CD33, Seattle Genentech); Zanolimumab (HuMax-CD4) (CD4, Genmab); HCD122 (CD40, Novartis); SGN-40 (CD40, Seattle Genentech); Campath1h (Alemtuzumab) (CD52, Genzyme); MDX-1411 (CD70, Medarex); hLL1 (EPB-1) (CD74.38, Immunomedics); Galiximab (IDEC-144) (CD80, Biogen); MT293 (TRC093/D93) (colágeno escindido, Tracon); HuLuc63 (CS 1, PDL Pharma); ipilimumab (MDX-010) (CTLA4, Bristol Myers Squibb); Tremelimumab (Ticilimumab, CP-675,2) (CTLA4, Pfizer); HGS-ETR1 (Mapatumumab) (agonista de DR4/TRAIL-R1, Human Genome Science/Glaxo Smith Kline); AMG-655 (DR5, Amgen); Apomab (DR5, Genentech); CS-1008 (DR5, Daiichi Sankyo); HGS-ETR2 (lexatumumab) (agonista de DR5/TRAIL-R2, HGS); Cetuximab (Erbix) (EGFR, Imclone); IMC-11F8, (EGFR, Imclone); Nimotuzumab (EGFR, YM Bio); Panitumumab (Vectabix) (EGFR, Amgen); Zalutumumab (HuMaxEGFr) (EGFR, Genmab); CDX-110 (EGFRvIII, AVANT Immunotherapeutics); adecatumumab (MT201) (Epcam, Merck); edrecolomab (Panorex, 17-1A) (Epcam, Glaxo/Centocor); MORAb-003 (receptor de folato a, Morphotech); KW-2871 (gangliósido GD3, Kyowa); MORAb-009 (GP-9, Morphotech); CDX-1307 (MDX-1307) (hCGb, Celldex); Trastuzumab (Herceptin) (HER2, Celldex); Pertuzumab (rhuMAB 2C4) (HER2 (DI), Genentech); apolizumab (HLA-cadena DR β , PDL Pharma); AMG-479 (IGF-1R, Amgen); anti-IGF-1R R1507 (IGF1-R, Roche); CP 751871 (IGF1-R, Pfizer); IMC-A12 (IGF1-R, Imclone); BIIB022 (IGF-1R, Biogen); Mik- β -1 (IL-2R β (CD122), Hoffman LaRoche); CNTO 328 (IL6, Centocor); Anti-KIR (1-7F9) (Receptor similar a Ig de célula asesina (KIR), Novo); Hu3S193 (Lewis (y), Wyeth, Ludwig Institute of Cancer Research); hCBE-11 (LT β R, Biogen); HuHMF1 (MUC1, Antisoma/NCI); RAV12 (epítipo de carbohidrato con enlace en N, Raven); CAL (proteína relacionada con la hormona paratiroide (PTH-rP), University of California); CT-011 (PD1, CureTech); MDX-1106 (ono-4538) (PD1, Medarex/Ono); MAb CT-011 (PD1, Curetech); IMC-3G3 (PDGFR α , Imclone); bavituximab (fosfatidilserina, Peregrine); huJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); muJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); GC1008 (TGF β (pan) inhibidor (IgG4), Genzyme); Infliximab (Remicade) (TNF α , Centocor); A27.15 (receptor de transferrina, Salk Institute, INSERN WO 2005/111082); E2.3 (receptor de transferrina, Salk Institute); Bevacizumab (Avastin) (VEGF, Genentech); HuMV833 (VEGF, Tsukuba Research Lab, publicación del PCT núm. WO/2000/034337, University of Texas); IMC-18F1 (VEGFR1, Imclone); IMC-1121 (VEGFR2, Imclone).

Ejemplos de anticuerpos parentales bispecíficos útiles incluyen, pero no se limitan a, aquellos con un anticuerpo dirigido contra un antígeno de células tumorales y el otro anticuerpo dirigido contra una molécula activadora citotóxica tal como anti-Fc γ R1/anti-CD 15, anti-p185^{HER2}/Fc γ RIII (CD16), anti-CD3/anti-célula B maligna (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-carcinoma de células renales, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anti-carcinoma de colon), anti-CD3/anti-análogo de hormona estimulante de melanocitos, anti-receptor de EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-molécula de adhesión de células neurales (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de unión a folato (FBP)/anti-CD3, anti-pan antígeno asociado a carcinoma (AMOC-31)/anti-CD3; anticuerpos bispecíficos con un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tumoral y otro anticuerpo que se une a una toxina tal como anti-saporina/anti-Id-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anti-cadena de ricina A, anti-interferón- α (IFN- α)/anti-idiotipo de hibridoma, anti-CEA/anti-vinca alcaloide; anticuerpos bispecíficos para convertir profármacos activados por enzimas tales como anti-CD30/anti-fosfatasa alcalina (que cataliza la conversión del profármaco de fosfato de mitomicina a alcohol de mitomicina); anticuerpos bispecíficos que pueden usarse como agentes fibrinolíticos tales como anti-fibrina/anti-activador tisular del plasminógeno (tPA), anti-fibrina/anti-activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA); anticuerpos bispecíficos para dirigirse a complejos inmunitarios con receptores de la superficie celular tales como anti-lipoproteína de baja densidad (LDL)/anti-receptor de Fc (p. ej. Fc γ R1, Fc γ R2 o Fc γ R3); anticuerpos bispecíficos para usar en la terapia de enfermedades infecciosas tales como anti-CD3/anti-virus del herpes simple (HSV), anti-complejo del receptor de células T:CD3/anti-influenza, anti-Fc γ R/anti-HIV; anticuerpos bispecíficos para la detección de tumores *in vitro* o *in vivo* tales como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-anti-p185^{HER2}/anti-hapteno; anticuerpos bispecíficos como adyuvantes de vacunas (ver Fanger, M W y otros, Crit Rev Immunol. 1992; 12(34):101-24); y anticuerpos bispecíficos como herramientas de diagnóstico como anti-IgG/anti-ferritina de conejo, peroxidasa de rábano picante (HRP)/anti-hormona, anti-somatostatina/anti-sustancia P, anti-HRP / anti-FITC, anti-CEA/anti- β -galactosidasa (ver Nolan, O et R. O'Kennedy, Biochim Biophys Acta. Agosto 1, 1990; 1040(1):1-11). Ejemplos de anticuerpos trispecíficos incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37.

Composiciones de anticuerpos

Los anticuerpos descritos en la presente pueden formularse en las composiciones usando los métodos disponibles en la técnica y los descritos en la presente. Cualquiera de los compuestos descritos en la presente puede proporcionarse en la composición farmacéutica apropiada y administrarse por una vía de administración adecuada.

En ciertos ejemplos, las composiciones de anticuerpos proporcionadas en la presente comprenden además un portador farmacéuticamente aceptable. El portador puede ser un diluyente, excipiente, o vehículo con el cual se administra la composición farmacéutica. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo aquellos de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa y glicerina acuosas pueden emplearse también como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerina, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerina, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampones de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir portadores estándares tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etc. Los ejemplos de los portadores farmacéuticos adecuados se describen en E.W. Martin, 1990, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.

En algunos ejemplos, la composición farmacéutica se proporciona en una forma adecuada para la administración a un sujeto humano. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica contendrá una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz del anticuerpo junto con una cantidad del portador para proporcionar la forma de administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

En algunos ejemplos, la composición farmacéutica se proporciona en una forma adecuada para la administración intravenosa. Típicamente, las composiciones adecuadas para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede incluir además un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaina para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Tal composición, sin embargo, puede administrarse por una vía distinta a la administración intravenosa.

En ejemplos particulares, la composición farmacéutica es adecuada para la administración subcutánea. En ejemplos particulares, la composición farmacéutica es adecuada para la administración intramuscular.

Los componentes de la composición farmacéutica pueden suministrarse ya sea por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua. Cuando la composición se administra por infusión, ésta puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, una ampolleta de agua estéril para inyección o solución salina puede proporcionarse de manera que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

En algunos ejemplos, la composición farmacéutica se suministra como un polvo liofilizado esterilizado seco que es capaz de ser reconstituido hasta la concentración apropiada para la administración a un sujeto. En algunos ejemplos, los anticuerpos se suministran como un concentrado sin agua. En algunos ejemplos, el anticuerpo se suministra como un polvo liofilizado estéril seco a una dosificación unitaria de al menos 0.5 mg, al menos 1 mg, al menos 2 mg, al menos 3 mg, al menos 5 mg, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 30 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 60 mg, o al menos 75 mg.

En otro ejemplo, la composición farmacéutica se suministra en forma líquida. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica se proporciona en forma líquida y es sustancialmente libre de surfactantes y/o sales inorgánicas. En algunos ejemplos, el anticuerpo se suministra en forma líquida a una dosificación unitaria de al menos 0.1 mg/ml, al menos 0.5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2.5 mg/ml, al menos 3 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 30 mg/ml, o al menos 60 mg/ml.

En algunos ejemplos, la composición farmacéutica se formula como una forma de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las que se forman con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las que se forman con cationes tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

En el uso terapéutico, el médico determinará la posología más adecuada de acuerdo con un tratamiento preventivo o curativo y según la edad, el peso, el estadio de la infección y otros factores específicos del sujeto a tratar. En ciertos ejemplos, las dosis son de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg por día para un adulto, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 250 mg por día o de aproximadamente 10 a 50 mg por día para un adulto. En ciertos ejemplos, las dosis son de aproximadamente 5 a aproximadamente 400 mg por día o 25 a 200 mg por día por adulto. En ciertos ejemplos, tasas de dosis de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 mg por día también se contemplan.

65

Métodos de uso para terapia o profilaxis

5 Ciertos anticuerpos proporcionados en la presente pueden usarse para el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad o afección considerada adecuada por el experto en la técnica. Generalmente, un método de tratamiento o prevención abarca la administración de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del anticuerpo o composición del anticuerpo a un sujeto que necesita de este para tratar o prevenir la enfermedad o afección.

10 Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o composición es una cantidad que es eficaz para reducir la gravedad, la duración y/o los síntomas de una enfermedad o afección particular. La cantidad del anticuerpo o composición que será terapéuticamente eficaz en la prevención, gestión, tratamiento y/o mejoramiento de una enfermedad particular puede determinarse mediante técnicas clínicas estándares. La cantidad precisa del anticuerpo o composición que va a administrarse dependerá, en parte, de la vía de administración, la gravedad de la enfermedad o afección particular, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada sujeto.

15 En algunos ejemplos, la cantidad eficaz del anticuerpo proporcionado en la presente está entre aproximadamente 0.025 mg/kg y aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal de un sujeto humano. En ciertos ejemplos, el anticuerpo se administra a un sujeto humano en una cantidad de aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 950 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 900 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 850 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 800 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 750 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 700 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 650 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 600 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 550 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 450 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 95 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 90 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 85 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 70 mg/kg de peso corporal o menos, o aproximadamente 65 mg/kg de peso corporal o menos.

35 En algunos ejemplos, la cantidad eficaz del anticuerpo proporcionado en la presente está entre aproximadamente 0.025 mg/kg y aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal de un sujeto humano. En algunos ejemplos, la cantidad eficaz de un anticuerpo de la composición farmacéutica proporcionada en la presente es aproximadamente 0.025 mg/kg o menos, aproximadamente 0.05 mg/kg o menos, aproximadamente 0.10 mg/kg o menos, aproximadamente 0.20 mg/kg o menos, aproximadamente 0.40 mg/kg o menos, aproximadamente 0.80 mg/kg o menos, aproximadamente 1.0 mg/kg o menos, aproximadamente 1.5 mg/kg o menos, aproximadamente 3 mg/kg o menos, aproximadamente 5 mg/kg o menos, aproximadamente 10 mg/kg o menos, aproximadamente 15 mg/kg o menos, aproximadamente 20 mg/kg o menos, aproximadamente 25 mg/kg o menos, aproximadamente 30 mg/kg o menos, aproximadamente 35 mg/kg o menos, aproximadamente 40 mg/kg o menos, aproximadamente 45 mg/kg o menos, aproximadamente 50 mg/kg o menos, o aproximadamente 60 mg/kg o menos.

45 La composición farmacéutica del método puede administrarse usando cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse por administración intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa subcutánea, o cualquier combinación de estas. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea. En algunos ejemplos, la composición se administra por vía intravenosa. En algunos ejemplos, la composición se administra por vía intramuscular.

Métodos de uso para detección o diagnóstico

50 Los anticuerpos proporcionados en la presente pueden usarse para la detección de cualquier objetivo o para el diagnóstico de cualquier enfermedad o afección considerada adecuada por el experto en la técnica. Los métodos abarcan detectar la unión de un anticuerpo a un antígeno objetivo en el lugar adecuado, por ejemplo, el cuerpo, tejido o célula apropiado. En los métodos, la formación de un complejo entre el anticuerpo y el antígeno puede detectarse por cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen ensayos que usan reactivos secundarios para la detección, ensayos ELISA e inmunoprecipitación y aglutinación. Una descripción detallada de estos ensayos es, por ejemplo, dada en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988 555-612, WO96/13590 de Maertens y Stuyver, Zrein y otros. (1998) y WO96/29605.

60 Para el diagnóstico *in situ*, el anticuerpo puede administrarse a un sujeto por los métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial de manera que puede producirse una unión específica entre un anticuerpo de acuerdo con la presente descripción con una región de epítipo en la proteína amiloide. El complejo anticuerpo/antígeno puede detectarse convenientemente a través de un marcador unido al anticuerpo o cualquier otro método de detección conocido en la técnica.

65 Además, en la presente descripción se proporcionan kits para la detección o diagnóstico. Los kits ejemplares

comprenden uno o más anticuerpos proporcionados en la presente descripción junto con uno o más reactivos útiles para detectar un complejo entre el uno o más anticuerpos y sus antígenos objetivo.

Preparación de anticuerpos

5

Los anticuerpos descritos en la presente pueden prepararse mediante cualquier técnica evidente para los expertos en la técnica sin limitación. Las técnicas útiles para la preparación incluyen síntesis *in vivo*, por ejemplo con ARNt y ARNt sintetasa modificados, síntesis libre de células, por ejemplo con ARNt y ARNt sintetasa modificados, síntesis de polipéptidos en fase sólida y síntesis de polipéptidos en fase líquida. Técnicas ilustrativas se describen en esta sección y en los ejemplos más abajo.

10

15

En ciertos métodos, el anticuerpo se traduce y/o transcribe de uno o más polinucleótidos que codifican las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. En consecuencia, en la presente descripción se proporcionan polinucleótidos capaces de codificar los anticuerpos que tienen uno o más aminoácidos no naturales en posiciones sitio-específicas en una o más cadenas de polipéptidos. En ciertos ejemplos, los polinucleótidos comprenden un codón no asociado normalmente con un aminoácido en la posición del polinucleótido correspondiente a la posición del polipéptido sitio específica para el aminoácido no natural. Ejemplos de tales codones incluyen codones de parada, codones de 4 bp, codones de 5 bp, y similares. La mezcla de reacción típicamente comprende una ARNt sintetasa capaz de producir ARNt que complementan (suprimen) dicho codón. Estos ARNt supresores se enlazan a los aminoácidos no naturales para facilitar su incorporación en el polipéptido en el sitio del codón supresor.

20

25

Los anticuerpos pueden prepararse por técnicas conocidas para los expertos en la técnica para expresar tales polinucleótidos que incorporan aminoácidos no naturales en posiciones sitio específicas de una cadena de polipéptido. Tales técnicas se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 7,045,337 y 7,083,970, en la publicación de las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. . US 2008/0317670, US 2009/0093405, US 2010/0093082, US 2010/0098630, US 2008/0085277 y en la publicación internacional de patente núms. WO 2004/016778 A1 y WO 2008/066583 A2.

30

En ciertos ejemplos, un anticuerpo puede prepararse en una mezcla de reacción sin células que comprende al menos un ARNt ortogonal aminoacilado con un aminoácido no natural, donde la base del ARNt ortogonal se aparea con un codón que no está asociado normalmente con un aminoácido, por ejemplo un codón de parada; un codón de 4 pb, etc. La mezcla de reacción comprende además una ARNt sintetasa capaz de aminoacilar el ARNt ortogonal con un aminoácido no natural. Usualmente la ARNt sintetasa ortogonal, que es susceptible a degradación por proteasas presente en extractos de células bacterianas, se sintetiza exógenamente y se añade a la mezcla de reacción antes del inicio de la síntesis del polipéptido. El ARNt ortogonal puede sintetizarse en las células bacterianas a partir de las cuales se obtiene el extracto celular, puede sintetizarse *de novo* durante la reacción de síntesis del polipéptido, o puede añadirse exógenamente a la mezcla de reacción.

35

40

En ciertos ejemplos, una variante de la aminoacil ARNt sintetasa proporcionada en la sec. con núm. de ident.: 5 se usa para catalizar la unión de un aminoácido no natural a un ARNt compatible. Las variantes de la aminoacil ARNt sintetasa de la sec. con núm. de ident.: 5 son particularmente ventajosas cuando se utilizan aminoácidos que comprenden grupos funcionales de tetrazina, como los proporcionados en cualquiera de las Fórmulas AI, Ala, AII, AIII, AIV, AV, AVI, AVII, AVIII, AIX, y (A1)-(A10). En ciertos ejemplos, una variante de la sec. con núm. de ident.: 5 con las siguientes mutaciones, designada "2A2", puede ser particularmente ventajosa para el uso con un aminoácido no natural de la Fórmula A9: Y32L, L65V, H70A, F108W, Q109S, D158V, I159A, y L162V (sec. con núm. de ident.: 6). En algunos ejemplos, una variante de la sec. con núm. de ident.: 5 con las siguientes mutaciones, designado "2A9", puede ser particularmente ventajosa para el uso con un aminoácido no natural de la Fórmula A6: Y32G, L65V, H70A, Q109S, D158G, y L162S (sec. con núm. de ident.: 7). Otras aminoacil ARNt sintetastas que pueden ser útiles con los compuestos de la presente descripción incluyen la mtaF sintetasa divulgada en Seitchik y otros, J. Am. Chem. Soc., 2012, 134:2898-2901 y otras variantes de la sec. con núm. de ident.: 5. Variantes de la sec. con núm. de ident.: 5 pueden prepararse mediante mutagénesis y seleccionarse para identificar sintetastas mutantes que actúan sobre cualquier aminoácido no natural de interés. Dicha mutagénesis puede ser completamente aleatoria, o puede ser determinística con respecto a la ubicación permitida de la(s) mutación(es) y/o el(los) residuo(s) en una porción particular de la secuencia del polipéptido sintetasa. Ejemplos de métodos para la mutagénesis aleatoria de las sintetastas pueden encontrarse en Seitchik y otros, citado anteriormente.

55

60

En ciertos ejemplos, los componentes que afectan la inserción de aminoácidos no naturales y la inserción o plegamiento de proteínas se añaden opcionalmente a la mezcla de reacción. Dichos componentes incluyen concentraciones elevadas de factores de traducción para minimizar el efecto de los factores de liberación 1 y 2 y para optimizar adicionalmente las concentraciones de componentes ortogonales. Proteínas chaperonas (Sistema Dsb de oxidoreductasas e isomerasas, GroES, GroEL, DNAJ, DNAK, Skp, etc.) pueden añadirse exógenamente a la mezcla de reacción o pueden sobreexpresarse en las células fuente usadas para preparar el extracto celular. Las reacciones pueden usar un reactor a gran escala, a pequeña escala, o pueden multiplexarse para realizar una pluralidad de síntesis simultáneas. Las reacciones continuas usarán un mecanismo de alimentación para introducir un flujo de reactivos y pueden aislar el producto final como parte del proceso. Los sistemas por lotes son también de interés, donde los reactivos adicionales pueden introducirse para prolongar el periodo de tiempo para la síntesis activa. Un reactor puede

65

trabajar en cualquier modo, tal como por lotes, lote extendido, semi-flujo, semicontinuo, alimentado por lotes y continuo, y se seleccionará de acuerdo con el propósito de la aplicación. Las reacciones pueden ser de cualquier volumen, ya sea en una escala pequeña, usualmente al menos aproximadamente 1 µl y no más de aproximadamente 15 µl, o en una reacción de escalado, donde el volumen de reacción es al menos aproximadamente 15 µl, usualmente al menos aproximadamente 50 µl, más usualmente al menos aproximadamente 100 µl, y puede ser 500 µl, 1000 µl, o mayor. En principio, las reacciones pueden realizarse a cualquier escala siempre y cuando se suministre suficiente oxígeno (u otro aceptor de electrones) cuando sea necesario.

Los métodos útiles para la síntesis donde al menos un aminoácido no natural se introduce en la cadena de polipéptido durante la elongación incluyen pero no se limitan a: (I) adición de sintetasa ortogonal purificada exógena, aminoácido no natural y ARNt ortogonal a la reacción libre de células, (II) adición de sintetasa ortogonal purificada exógena y aminoácido no natural a la mezcla de reacción, pero donde el ARNt ortogonal se transcribe durante la reacción libre de células, (III) adición de sintetasa ortogonal purificada exógena y aminoácido no natural a la mezcla de reacción, pero con el ARNt ortogonal sintetizado por el organismo fuente de extracto celular. En ciertos ejemplos, los componentes ortogonales son impulsados por promotores regulables, de modo que los niveles de síntesis pueden controlarse aunque pueden usarse otras medidas tales como controlar el nivel de las plantillas de ADN relevantes por adición o digestión específica.

En algunos ejemplos, un sistema de expresión libre de células bacterianas se usa para producir variantes de proteínas o péptidos con aminoácidos no nativos (nnAA). El uso de extractos libres de células bacterianas para la síntesis de proteína *in vitro* ofrece varias ventajas sobre los métodos de expresión de proteína *in vivo* convencionales. Los sistemas libres de células pueden dirigir la mayoría, si no todos, los recursos metabólicos de la célula hacia la producción exclusiva de una proteína. Por otra parte, la falta de una pared celular y componentes de membrana *in vitro* es ventajosa ya que permite el control del entorno de síntesis. Sin embargo, la eficiencia de extractos libre de células puede disminuirse por las proteínas bacterianas que inhiben la síntesis de proteínas, ya sea directa o indirectamente. Así, la inactivación de proteínas indeseables que disminuyen la eficiencia de la síntesis de proteína debe aumentar el rendimiento de las proteínas deseables en extractos libres de células. Por ejemplo, la inactivación de proteínas que disminuyen la eficiencia de la síntesis de proteína debe aumentar el rendimiento de polipéptidos que tienen aminoácidos no nativos incorporados en un residuo de aminoácido definido. La introducción de nnAA en los polipéptidos es útil para aumentar la función y la diversidad biológica de las proteínas. Un enfoque para producir polipéptidos que tienen un nnAA incorporado en un residuo de aminoácido definido es usar un nnAA, ARNt que contiene CUA ortogonal aminoacilado para la introducción del nnAA en el polipéptido naciente en un codón ámbar (parada) durante la traducción de la proteína. Sin embargo, la incorporación de nnAA en un codón ámbar puede inhibirse por el complejo de terminación bacteriano nativo, que normalmente reconoce el codón de parada y termina la traducción. El Factor de liberación 1 (RF1) es una proteína compleja de terminación que facilita la terminación de la traducción al reconocer el codón ámbar en una secuencia de ARNm. El reconocimiento del codón de parada ámbar por la RF1 puede promover productos de truncamiento prematuros en el sitio de incorporación de aminoácidos no nativos, y por lo tanto, disminuye el rendimiento de proteína. Por lo tanto, la atenuación de la actividad de RF1 puede aumentar la incorporación de nnAA en proteínas recombinantes.

Se ha demostrado previamente que la incorporación de nnAA se puede aumentar atenuando la actividad de RF1 de 3 maneras: 1) neutralizar la inactivación de anticuerpo de RF1, 2) silenciamiento genómico de RF1 (en una cepa reforzada con RF2), y 3) eliminación sitio-específica de RF1 usando una cepa diseñada para expresar RF1 que contiene una etiqueta de proteína para la eliminación por cromatografía de afinidad (Dominio de Unión a Quitina y Etiqueta His). Otro método para inactivar RF1 comprende introducir sitios de escisión proteolítica en la secuencia de aminoácidos de RF1. Los sitios de escisión no son accesibles a la proteasa durante el crecimiento de las células bacterianas, pero son escindidos por la proteasa cuando las células bacterianas son lisadas para producir el extracto libre de células. Por lo tanto, el rendimiento de los polipéptidos de longitud completa que tienen un nnAA incorporado en un codón ámbar aumenta en extractos de células bacterianas que expresan dichas variantes de RF1 modificadas.

En algunos ejemplos, para producir anticuerpos que comprenden un aminoácido no natural, se necesita una plantilla de ácido nucleico. Las plantillas para la síntesis de proteína libre de células pueden ser ARNm o ADN. La plantilla puede comprender secuencias para cualquier anticuerpo particular de interés, y puede codificar un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de cualquier longitud del mismo. Los ácidos nucleicos que sirven como plantillas para la síntesis de proteínas se derivan opcionalmente de una fuente natural o pueden ser sintéticos o recombinantes. Por ejemplo, los ADN pueden ser ADN recombinantes, por ejemplo, plásmidos, virus o similares.

En algunos ejemplos, una vez que se produce una plantilla de ácido nucleico de un anticuerpo, la plantilla se usa para sintetizar el anticuerpo en un sistema de traducción libre de células. Por ejemplo, la plantilla se puede añadir a un lisado celular en condiciones suficientes para traducir la plantilla en proteína. El lisado celular puede ser de células bacterianas o células eucariotas. La proteína expresada puede purificarse luego usando métodos conocidos en la técnica, como se describe a continuación.

En algunos ejemplos, un sistema de traducción (por ejemplo, un sistema de síntesis de proteínas *in vitro*) se usa para producir el anticuerpo con uno o más nnAA incorporados en él. Un sistema de traducción ilustrativo comprende un extracto libre de células, un lisado celular o un sistema de traducción reconstituido, junto con la plantilla de ácido

nucleico para la síntesis del polipéptido o proteína deseados que tienen aminoácidos no naturales en posiciones preseleccionadas (definidas). La mezcla de reacción comprenderá, además, monómeros para la macromolécula a sintetizar, por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, etc., y tales cofactores, enzimas y otros reactivos que son necesarios para la síntesis, por ejemplo, ribosomas, ARNt, polimerasas, factores transcripcionales, etc. Además de los componentes anteriores, tales como un extracto libre de células, una plantilla de ácido nucleico y aminoácidos, pueden añadirse a la reacción materiales específicamente requeridos para la síntesis de proteínas. Los materiales incluyen sales, ácido folínico, AMP cíclico, inhibidores de las enzimas degradadoras de proteínas o ácidos nucleicos, inhibidores o reguladores de la síntesis de proteínas, ajustadores de potenciales de oxidación/reducción, surfactantes no desnaturizantes, componentes tampón, espermina, espermidina, putrescina, etc. Varios sistemas de reacción de síntesis libre de células son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Kim, D.M. y Swartz, J.R. *Biotechnol. Bioeng.* 66:180-8 (1999); Kim, D.M. y Swartz, J.R. *Biotechnol. Prog.* 16:385-90 (2000); Kim, D.M. y Swartz, J.R. *Biotechnol. Bioeng.* 74:309-16 (2001); Swartz y otros, *Métodos Mol Biol.* 267:169-82 (2004); Kim, D.M. y Swartz, J.R. *Biotechnol. Bioeng.* 85:122-29 (2004); Jewett, M.C. y Swartz, J.R., *Biotechnol. Bioeng.* 86:19-26 (2004); Yin, G. y Swartz, J.R., *Biotechnol. Bioeng.* 86:188-95 (2004); Jewett, M.C. y Swartz, J.R., *Biotechnol. Bioeng.* 87:465-72 (2004); Voloshin, A.M. y Swartz, J.R., *Biotechnol. Bioeng.* 91:516-21 (2005). Condiciones adicionales para la síntesis libre de células de los polipéptidos deseados se describen en WO2010/081110.

En algunos ejemplos, una plantilla de ADN se usa para conducir la síntesis de proteína *in vitro*, y ARN polimerasa se añade a la mezcla de reacción para proporcionar transcripción mejorada de la plantilla de ADN. ARN polimerasas adecuadas para usar en la presente incluyen cualquier ARN polimerasa que funciona en la bacteria de la que se deriva el extracto bacteriano. En otros ejemplos, una plantilla de ARN se usa para conducir la síntesis de proteína *in vitro*, y los componentes de la mezcla de reacción se pueden mezclar entre sí en cualquier orden conveniente, pero se mezclan preferentemente en un orden en donde la plantilla de ARN se añade en último lugar, minimizando así la degradación potencial de la plantilla de ARN por nucleasas.

En algunos ejemplos, un sistema de traducción libre de células se usa para producir el anticuerpo con uno o más nAAs incorporados en el mismo. La síntesis de proteína libre de células explota el poder catalítico de la maquinaria celular. Obtener rendimientos proteicos máximos *in vitro* requiere un suministro adecuado de sustrato, por ejemplo, nucleósidos trifosfatos y aminoácidos, un ambiente homeostático, estabilidad del catalizador y la eliminación o elusión de subproductos inhibidores. La optimización de reacciones sintéticas *in vitro* se beneficia al recrear el estado *in vivo* de un organismo de rápido crecimiento. En algunos ejemplos, la síntesis libre de células por lo tanto, se realiza en una reacción donde se activa la fosforilación oxidativa. Detalles adicionales se describen la patente de Estados Unidos núm. 7,338,789.

La síntesis de proteína *in vitro*, o libre de células, ofrece varias ventajas sobre los métodos de expresión de proteína *in vivo* convencionales. Los sistemas libres de células pueden dirigir la mayoría, si no todos, los recursos metabólicos de la célula hacia la producción exclusiva de una proteína. Además, la falta de una pared celular y componentes de membrana *in vitro* es ventajosa ya que permite el control del entorno de síntesis. Por ejemplo, los niveles de ARNt pueden cambiar para reflejar el uso del codón de genes que se expresan. El potencial redox, el pH o la fuerza iónica también se pueden alterar con mayor flexibilidad que con la síntesis de proteína *in vivo* porque no existen preocupaciones sobre el crecimiento o la viabilidad celular. Además, puede lograrse fácilmente la recuperación directa de productos proteínicos purificados y correctamente plegados. En algunos ejemplos, la productividad de los sistemas libre de células ha mejorado más de 2 órdenes de magnitud en los últimos años, de aproximadamente 5 µg/ml-h a aproximadamente 500 µg/ml-h.

En ciertos ejemplos, la ARNt sintetasa se sintetiza exógenamente y se añade a la mezcla de reacción libre de células. En ciertos ejemplos, la mezcla de reacción se prepara a partir de células bacterianas en las cuales ompT se ha inactivado o es naturalmente inactivo. Se cree que OmpT degrada los componentes de la mezcla de reacción, incluida la ARNt sintetasa.

Además de los componentes anteriores tales como el extracto libre de células, la plantilla genética, y los aminoácidos, a la reacción pueden añadirse materiales específicamente requeridos para la síntesis de proteína. Estos materiales incluyen sales, ácido folínico, AMP cíclico, inhibidores de enzimas degradantes de proteínas o ácidos nucleicos, inhibidores o reguladores de la síntesis de proteínas, ajustadores de potencial(es) de oxidación/reducción, surfactantes no desnaturizantes, componentes tampón, espermina, espermidina, putrescina, etc.

Las sales preferentemente incluyen sales de potasio, magnesio, y amonio (por ejemplo de ácido acético o ácido glutámico). Una o más de tales sales pueden tener un aminoácido alternativo como contra anión. Existe una interdependencia entre las especies iónicas para una concentración óptima. Estas especies iónicas son típicamente optimizadas con respecto a la producción de proteínas. Al cambiar la concentración de un componente particular del medio de reacción, la del otro componente puede cambiar en consecuencia. Por ejemplo, las concentraciones de varios componentes tal como nucleótidos y compuestos fuente de energía se pueden ajustar simultáneamente de acuerdo con el cambio en los de otros componentes. Además, los niveles de concentración de los componentes en el reactor pueden variar a lo largo del tiempo. El ajustador del potencial de oxidación/reducción puede ser ditiotreitól, ácido ascórbico, glutatión y o sus formas oxidadas.

- 5 En ciertos ejemplos, la reacción puede proceder en un modo de diálisis, en un modo lote de diafiltración, en un modo de lotes alimentados o un modo de operación semicontinua. En ciertos ejemplos, se puede suministrar una solución de alimentación al reactor a través de una membrana o a través de una unidad de inyección. El anticuerpo sintetizado puede acumularse en el reactor seguido de aislamiento o purificación después de la finalización de la operación del sistema. Las vesículas que contienen el anticuerpo también se pueden aislar continuamente, por ejemplo mediante adsorción por afinidad de la mezcla de reacción *in situ* o en un circuito de circulación a medida que el fluido de reacción se bombea más allá de la matriz de adsorción.
- 10 Durante la síntesis de proteínas en el reactor, el medio de aislamiento de proteínas para aislar selectivamente la proteína deseada puede incluir una unidad empaquetada con partículas recubiertas con moléculas de anticuerpo u otras moléculas para adsorber la proteína deseada sintetizada. Preferentemente, el medio de aislamiento de proteínas comprende dos columnas para uso alterno.
- 15 El anticuerpo resultante se puede purificar o aislar mediante técnicas estándar. Las técnicas ilustrativas se proporcionan en los ejemplos más abajo.

Método de ensayo

- 20 Los anticuerpos pueden ensayarse para su actividad esperada, o para una nueva actividad, de acuerdo con cualquier ensayo evidente para los expertos en la técnica. El anticuerpo resultante puede ensayarse en un ensayo funcional o cuantificando la cantidad de proteína presente en un ensayo no funcional, por ejemplo inmunotinción, ELISA, cuantificación en Coomassie o gel teñido con plata, etc., y determinando la relación de proteína biológicamente activa respecto a la proteína total.
- 25 La cantidad de proteína producida en una reacción de traducción puede medirse de varias maneras. Un método se basa en la disponibilidad de un ensayo que mide la actividad de la proteína particular que se está traduciendo. Un ejemplo de un ensayo para medir la actividad proteica es un sistema de ensayo de luciferasa, o sistema de ensayo de cloranfenicol acetil transferasa. Estos ensayos miden la cantidad de proteína funcionalmente activa producida a partir de la reacción de traducción. Los ensayos de actividad no medirán la proteína de longitud completa que está inactiva debido al plegamiento incorrecto de la proteína o la falta de otras modificaciones postraduccionales necesarias para la actividad de la proteína.
- 30 Otro método para medir la cantidad de proteína producida en reacciones de transcripción y traducción *in vitro in vitro* consiste en realizar las reacciones usando una cantidad conocida de aminoácidos radiomarcados como ³⁵S-metionina, ³H-leucina o ¹⁴C-leucina y posteriormente midiendo la cantidad de aminoácido radiomarcado incorporado en la proteína recién traducida. Los ensayos de incorporación medirán la cantidad de aminoácidos radiomarcados en todas las proteínas producidas en una reacción de traducción *in vitro* que incluye productos proteicos truncados. La proteína radiomarcada se puede separar adicionalmente en un gel de proteína, y mediante autorradiografía se confirma que el producto tiene el tamaño adecuado y que no se han producido productos proteínicos secundarios.
- 35
- 40

Ejemplos

- 45 Como se usa en la presente, los símbolos y convenciones usados en estos procesos, esquemas y ejemplos, independientemente de si una abreviatura particular está específicamente definida, son consistentes con los usados en la literatura científica contemporánea, por ejemplo, el Journal of Biological Chemistry.
- 50 Para todos los ejemplos siguientes, se pueden usar métodos estándar de tratamiento y purificación conocidos por los expertos en la técnica. A menos que se indique de cualquier otra forma, todas las temperaturas se expresan en °C (grados centígrados). Todos los métodos se realizan a temperatura ambiente salvo que se indique lo contrario.

Ejemplo 1: Incorporación múltiple de aminoácidos no naturales en cadenas pesadas

- 55 Este ejemplo demuestra que las reacciones de síntesis de proteína libre de células (CFPS) con el factor 1 de liberación (RF1) atenuado facilitan la incorporación de hasta 5 aminoácidos no naturales (nnAA) por el polipéptido de cadena pesada (HC) de inmunoglobulina G (IgG).

- 60 La cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de IgG de Herceptin se expresaron en reacciones de CFPS durante 12 h a 30 °C. Las plantillas de ADN de HC de IgG no contienen codón TAG (WT), contienen un codón TAG en Ser136, Asn297, o múltiples codones TAG (1TAG = Ala118, 2TAG = Ala118/Val5, 3TAG = Ala118/Val5/Ser136, 4TAG = Ala118/Val5/Ser136/Asn297, 5TAG = Ala118/Val5/Ser136/Asn297/Asn384). Las reacciones de expresión se realizaron en presencia de ¹⁴C-Leu para el marcaje metabólico de las proteínas sintetizadas. Las muestras de la reacción de expresión se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Las muestras analizadas eran muestras sin tratamiento de ebullición, ni reducción de la fracción soluble de la reacción de CFPS (Figura 1A) y muestras tratadas por ebullición, reducidas, de la reacción de CFPS total (Figura 1B).
- 65

En presencia de RF1, la incorporación de nnAA es hasta 2 nnAA por polipéptido de HC de IgG. La Figura 1B ilustra el alto rendimiento de proteína total que contiene nnAA obtenido en las reacciones. Estos datos ejemplifican un sistema que permite la fácil incorporación de múltiples nnAA por polipéptido.

Ejemplo 2: Expresión de HC de IgG de Herceptin con dos aminoácidos no naturales

Este ejemplo proporciona el diseño y la expresión de 45 cadenas pesadas de HERCEPTIN, cada una con dos aminoácidos no naturales diferentes en ubicaciones sitio-específicas.

Generación de plantillas de PCR. Diez genes de cadena pesada con mutación de TAG simple, R19, S25, A40, Y52, T117, S119, Y180, D221, K222 y F404 en el plásmido pYD, se usaron como plantillas para la generación de plantillas mutantes TAG dobles. Como se enumera en la Tabla 1 cuarenta y cinco plantillas de expresión de mutantes TAG dobles de HC se generaron por PCR de cebadores superpuestos, que se describe en la Figura 2.

Tabla 1-1, 45 mutantes TAG dobles de HC

| | R19 | S25 | A40 | Y52 | T117 | S119 | Y180 | D221 | K222 | F404 |
|------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|
| R19 | | | | | | | | | | |
| S25 | x | | | | | | | | | |
| A40 | x | x | | | | | | | | |
| Y52 | x | x | x | | | | | | | |
| T117 | x | x | x | x | | | | | | |
| S119 | x | x | x | x | x | | | | | |
| Y180 | x | x | x | x | x | x | | | | |
| D221 | x | x | x | x | x | x | x | | | |
| K222 | x | x | x | x | x | x | x | x | | |
| F404 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | |

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando la mezcla maestra Phusion Hot Start Flex 2X (New England Biolabs) de acuerdo con los protocolos sugeridos por el fabricante. Generalmente se llevó a cabo una PCR de cebadores superpuestos en dos etapas para introducir mutaciones de TAG dobles en el gen de HC (Figura 2). Las plantillas de ADN generadas por PCR se purificaron usando el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) para su aplicación en la expresión libre de células. Después de la purificación de la PCR las variantes se secuenciaron por Mclab (South San Francisco, CA) para confirmar las mutaciones esperadas.

Tabla 1-2 Cebadores y plantillas usados en la primera ronda de PCR

| Mutaciones | | fragmento 5' | | | fragmento 3' | | |
|------------|------|--------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|
| 1ra | 2da | cebador 1 | cebador 2 | plantilla | cebador 1 | cebador 2 | Plantilla |
| R20 | S26 | 5chiT2PT7 | 3R20 | R20 | 5R20S26 | 3chiT2TT7 | R20 |
| | A41 | 5chiT2PT7 | 3R20 | R20 | 5R20 | 3chiT2TT7 | A41 |
| | Y53 | 5chiT2PT7 | 3R20 | R20 | 5R20 | 3chiT2TT7 | Y53 |
| | T118 | 5chiT2PT7 | 3R20 | R20 | 5R20 | 3chiT2TT7 | T118 |
| | S123 | 5chiT2PT7 | 3R20 | R20 | 5R20 | 3chiT2TT7 | S123 |
| | Y184 | 5chiT2PT7 | 3R20 | R20 | 5R20 | 3chiT2TT7 | Y184 |
| | D225 | 5chiT2PT7 | 3R20 | R20 | 5R20 | 3chiT2TT7 | D225 |
| | K226 | 5chiT2PT7 | 3R20 | R20 | 5R20 | 3chiT2TT7 | K226 |
| | F408 | 5chiT2PT7 | 3R20 | R20 | 5R20 | 3chiT2TT7 | F408 |
| S26 | A41 | 5chiT2PT7 | 3S26 | S26 | 5S26 | 3chiT2TT7 | A41 |
| | Y53 | 5chiT2PT7 | 3S26 | S26 | 5S26 | 3chiT2TT7 | Y53 |

ES 2 658 039 T3

| Mutaciones | | fragmento 5' | | | fragmento 3' | | |
|------------|------|--------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|
| 1ra | 2da | cebador 1 | cebador 2 | plantilla | cebador 1 | cebador 2 | Plantilla |
| | T118 | 5chiT2PT7 | 3S26 | S26 | 5S26 | 3chiT2TT7 | T118 |
| | S123 | 5chiT2PT7 | 3S26 | S26 | 5S26 | 3chiT2TT7 | S123 |
| | Y184 | 5chiT2PT7 | 3S26 | S26 | 5S26 | 3chiT2TT7 | Y184 |
| | D225 | 5chiT2PT7 | 3S26 | S26 | 5S26 | 3chiT2TT7 | D225 |
| | K226 | 5chiT2PT7 | 3S26 | S26 | 5S26 | 3chiT2TT7 | K226 |
| | F408 | 5chiT2PT7 | 3S26 | S26 | 5S26 | 3chiT2TT7 | F408 |
| A41 | Y53 | 5chiT2PT7 | 3A41 | A41 | 5A41 | 3chiT2TT7 | Y53 |
| | T118 | 5chiT2PT7 | 3A41 | A41 | 5A41 | 3chiT2TT7 | T118 |
| | S123 | 5chiT2PT7 | 3A41 | A41 | 5A41 | 3chiT2TT7 | S123 |
| | Y184 | 5chiT2PT7 | 3A41 | A41 | 5A41 | 3chiT2TT7 | Y184 |
| | D225 | 5chiT2PT7 | 3A41 | A41 | 5A41 | 3chiT2TT7 | D225 |
| | K226 | 5chiT2PT7 | 3A41 | A41 | 5A41 | 3chiT2TT7 | K226 |
| | F408 | 5chiT2PT7 | 3A41 | A41 | 5A41 | 3chiT2TT7 | F408 |
| Y53 | T118 | 5chiT2PT7 | 3Y53 | Y53 | 5Y53 | 3chiT2TT7 | T118 |
| | S123 | 5chiT2PT7 | 3Y53 | Y53 | 5Y53 | 3chiT2TT7 | S123 |
| | Y184 | 5chiT2PT7 | 3Y53 | Y53 | 5Y53 | 3chiT2TT7 | Y184 |
| | D225 | 5chiT2PT7 | 3Y53 | Y53 | 5Y53 | 3chiT2TT7 | D225 |
| | K226 | 5chiT2PT7 | 3Y53 | Y53 | 5Y53 | 3chiT2TT7 | K226 |
| | F408 | 5chiT2PT7 | 3Y53 | Y53 | 5Y53 | 3chiT2TT7 | F408 |
| T118 | S123 | 5chiT2PT7 | 3T118 | T118 | 5T118S123 | 3chiT2TT7 | T118 |
| | Y184 | 5chiT2PT7 | 3T118 | T118 | 5T118 | 3chiT2TT7 | Y184 |
| | D225 | 5chiT2PT7 | 3T118 | T118 | 5T118 | 3chiT2TT7 | D225 |
| | K226 | 5chiT2PT7 | 3T118 | T118 | 5T118 | 3chiT2TT7 | K226 |
| | F408 | 5chiT2PT7 | 3T118 | T118 | 5T118 | 3chiT2TT7 | F408 |
| S123 | Y184 | 5chiT2PT7 | 3S123 | S123 | 5S123 | 3chiT2TT7 | Y184 |
| | D225 | 5chiT2PT7 | 3S123 | S123 | 5S123 | 3chiT2TT7 | D225 |
| | K226 | 5chiT2PT7 | 3S123 | S123 | 5S123 | 3chiT2TT7 | K226 |
| | F408 | 5chiT2PT7 | 3S123 | S123 | 5S123 | 3chiT2TT7 | F408 |
| Y184 | D225 | 5chiT2PT7 | 3Y184 | Y184 | 5Y184 | 3chiT2TT7 | D225 |
| | K226 | 5chiT2PT7 | 3Y184 | Y184 | 5Y184 | 3chiT2TT7 | K226 |
| | F408 | 5chiT2PT7 | 3Y184 | Y184 | 5Y184 | 3chiT2TT7 | F408 |
| D225 | K226 | 5chiT2PT7 | 3D225 | D225 | 5D225K226 | 3chiT2TT7 | D225 |
| | F408 | 5chiT2PT7 | 3D225 | D225 | 5D225 | 3chiT2TT7 | F408 |
| K226 | F408 | 5chiT2PT7 | 3K226 | K226 | 5K226 | 3chiT2TT7 | F408 |

ES 2 658 039 T3

Tabla 1-3, Secuencias de los cebadores usados en la generación de plantillas de PCR

| Cebador | Secuencia | Sec. con núm. de ident. |
|-----------|---|-------------------------|
| 5chiT2PT7 | <u>GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGGCCGATT</u> CATTAATGCAGCTGGCACG ACAGG | 14 |
| 3chiT2TT7 | <u>GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGGCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAG</u> AAACGGC | 15 |
| 5chiT2 | GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGG | 16 |
| 3R20 | CTACAGGCTGCCACCAGGTTGTACCAG | 17 |
| 5R20S26 | GGTACAACCTGGTGGCAGCCTGTAGCTGTCTTGC GCGGCAtagGGTTTTAACAT TAAAG | 18 |
| 5R20 | GGTACAACCTGGTGGCAGCCTGTAGCTGTCTTGC GCGGCAAGCGGTTTTAACA TTAAAG | 19 |
| 3S26 | CTATGCCGCGCAAGACAGACGCAG | 20 |
| 5S26 | CTGCGTCTGTCTTGC GCGGCATAGGGTTTTAACATTAAGACACCTATATCCAC TGGGTGCG | 21 |
| 3A41 | CTATTGACGCACCCAGTGGATATAGGTGTC | 22 |
| 5A41 | GACACCTATATCCACTGGGTGCGTCAATAGCCGGTAAGGGCCTGGAATGGG | 23 |
| 3Y53 | CTAAATGC GCGCAACCCATTCCAGG | 24 |
| 5Y53 | CCTGGAATGGGTTGC GCGCATTTAGCCGACGAATGGTTATACCCGTTATGCGG | 25 |
| 3T118 | CTAAACCAGCGTACCCTGGCCCC | 26 |
| 5T118S123 | GGGGCCAGGGTACGCTGGTTTAGGTCAGCAGCGCTTAGACTAAAGGTCCTTC G | 27 |
| 5T118 | GGGGCCAGGGTACGCTGGTTTAGGTCAGCAGCGCTAGCACTAAAGGTCC | 28 |
| 3S123 | CTAAGCGCTGCTGACGGTAACCAGC | 29 |
| 5S123 | GCTGGTTACCGTCAGCAGCGCTTAGACTAAAGGTCCTTCGGTTTTTCCACTGGC TCC | 30 |
| 3Y184 | CTACAGGCCGCTAGATTGCAGAACTGCTG | 31 |
| 5Y184 | CAGCAGTTCTGCAATCTAGCGGCCTGTAGAGCCTGAGCTCCGTTGTGACGG | 32 |
| 3D225 | CTAACAAGATTTCCGGCTCCACCTTCTTGTCAACC | 33 |
| 5D225K226 | GGTTGACAAGAAGGTGGAGCCGAAATCTTGTTAGTAGACTCATACCTGTCCGC CGTGCC | 34 |
| 5D225 | | 35 |

| Cebador | Secuencia | Sec. con núm. de ident. |
|---------|---|-------------------------|
| | GGTTGACAAGAAGGTGGAGCCGAAATCTTGTTAGAAAACCTACACCTGTCCGC CGTGCC | |
| 3K226 | CTAATCACAAGATTTCGGCTCCACCTTCTTGCAACC | 36 |
| 5K226 | GGTTGACAAGAAGGTGGAGCCGAAATCTTGATTAGACTACACCTGTCCGC CGTGCC | 37 |

La Figura 2 proporciona la estrategia de PCR para generar plantillas de variantes de TAG dobles de HC para la expresión libre de células. En la Figura 2, X es el sitio TAG; PT7 es el promotor T7; y TT7 es el terminador T7. Además, en la Figura 2, 5chiT2PT7 es el oligonucleótido 5'-GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGGCCGATTTCAT TAATGCAGCTGGCAGACAGG-3' (sec. con núm. de ident.:14). 3chiT2TT7 es el oligonucleótido 5'-GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGGCCGATTTCAT TAATGCAGCTGGCAGACAGG-3' (sec. con núm. de ident.:15). 5chiT2 es el oligonucleótido 5'-GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGG-3' (sec. con núm. de ident.:16). En la primera etapa, se generaron dos fragmentos de PCR usando genes de variantes de HC con TAG simple como plantillas. Los cebadores y plantillas usados para la primera etapa de PCR se enumeran en la Tabla 1-2. La secuencia de cada cebador se enumera en la Tabla 1-3. En la segunda etapa, las variantes de HC con TAG dobles se generaron por PCR de cebadores superpuestos para ligar las variantes de PCR amplificadas en la primera etapa. Un solo cebador, 5chiT2, se usó en la segunda etapa de PCR.

15 Preparación de la proteína GamS

Se informó (Sitararman y otros, 2004, J Biotechnol. 110: 257-263) que una forma corta de la proteína Gam del fago λ (GamS) puede proteger una plantilla de ADN de PCR contra la degradación mediante la inhibición de la actividad de RecBCD (Exonucleasa V).

La proteína GamS se usó en este ejemplo para estabilizar las plantillas de PCR durante la reacción libre de células. En primer lugar, el gen de GamS se amplificó con una secuencia GGSHHHHHH C-terminal (sec. con núm. de ident.: 38) mediante los cebadores, 5'-ATATATCATATGAAC GCTTATTACATTCAGGATCGTCTTGAG-3' (sec. con núm. de ident.:39) y 5'-ATATATGTGCGACTTAATGATGATGATGATGATGAGAACCCCTACCTCTGAATCAATATCAACCTGGTGGTG-3' (sec. con núm. de ident.:40) usando pKD46 (Datsenko y Wanner, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645) como una plantilla. Después el gen de GamS se subclonó en un plásmido de expresión libre de células pYD317 en los sitios de restricción NdeI/Sall. Después, GamS se expresó *in vitro* y se purificó por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) con una pureza superior al 90 % (los datos no se muestran). La proteína GamS se almacenó a -70 °C antes de su aplicación en tampón Tris-Acetato 100 mM (pH 8.2), que contenía, además, acetato de potasio 160 mM, cloruro de sodio 200 mM y 10 % de sacarosa.

30 Expresión libre de células y supresión de nnAA

Las reacciones libres de células se llevaron a cabo en un volumen de 60 μ l a 30 °C en placas de 24 pocillos profundos (núm. de cat. 95040470, Thermo Scientific) durante 15 horas. Para expresar IgG con plantillas de PCR, se usó una concentración total de 15 nM de plantillas de PCR con relaciones molares de HC respecto a LC de 3 a 1.

Para estabilizar las plantillas de PCR en la reacción libre de células, se añadió la proteína GamS a 1.4 μ M, descrita anteriormente, para inhibir la actividad de RecBCD. La composición de la reacción incluía, además, glutamato de magnesio 8 mM, glutamato de potasio 130 mM, piruvato de sodio 35 mM, AMP 1.2 mM, 0.86 mM de cada uno de GMP, UMP y CMP, oxalato de sodio 4 mM, putrescina 1 mM, espermidina 1.5 mM, fosfato de potasio 15 mM, tirosina 1 mM, 2 mM de cada uno de los otros 19 aminoácidos, T7 ARN polimerasa 100 nM, 30 % (V/V) de extracto celular que era una mezcla que contenía 80 % de SBHS016 y 20 % de SBEZ023. Para facilitar la formación de disulfuro, el extracto de células S30 se trató con yodoacetamida (IAM) 50 μ M a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la reacción libre de células. Se añadió, además, glutatión oxidado (GSSG) 2 mM con la disulfuro isomerasa de *E. coli* DsbC a 1.2 μ M y PDI de levadura a 5.25 μ M.

Para analizar las variantes de IgG expresadas en el sistema libre de células con SDS-PAGE y autorradiograma, se llevaron a cabo reacciones en presencia de cantidades traza de [¹⁴C]-Leucina (300 μ Ci/mol; GE Life Sciences, NJ). Cuando se usó pN₃F (1 mM) para la supresión de TAG, se añadió Mj pN3FRS (aminoacil ARNt sintetasa de *M jannaschii* específica de pAzF) 5 μ M para la carga de tRNAPAZ/CUA. Cuando se usó pCH₂N₃F (1 mM) para la supresión de TAG, se añadió pCNFRS (aminoacil ARNt sintetasa de *M jannaschii* específica de pAzMeF) 10 μ M para la carga de tRNAPAZ/CUA.

SDS-PAGE y autorradiograma

Las muestras de reacción libre de células marcadas con ^{14}C -Leu se centrifugaron a la velocidad máxima en una centrifuga de mesa y se mezclaron 3 μl de sobrenadante con tampón de carga de muestra para SDS-PAGE de Invitrogen y agua. Las muestras se cargaron en geles de SDS-PAGE con 4~12 % de Bis-Tris (Invitrogen) y se corrieron con tampón de corrida MES durante 45 minutos. Después los geles se secaron y se expusieron a pantalla de fósforo (63-0034-86, GE healthcare, Estados Unidos) toda la noche, y se escanearon usando Storm 460 (GE healthcare, Estados Unidos). El rendimiento de cada proteína IgG de longitud completa se calculó en base a la densidad de la banda de 150 kD.

Supresión de TAG dobles de HC con pN_3F y $\text{pCH}_2\text{N}_3\text{F}$

Se expresaron 45 variantes de TAG dobles con plantillas de PCR a escala de 60 μl en placas de 24 pocillos en presencia de pN_3F o $\text{pCH}_2\text{N}_3\text{F}$ como se describe en la presente descripción. Los codones de parada ámbar en las secuencias de ADN de HC se suprimieron por tRNAPAZ/CUA cargado con aminoácido no nativo. SBHS016 se usó para la supresión de TAG ya que RF1 se degradó durante la preparación del extracto celular, lo que dio como resultado una mayor eficiencia de supresión de TAG por pN_3F o $\text{pCH}_2\text{N}_3\text{F}$. SBEZ023 contiene tRNAPAZ/CUA sobreexpresado, que se cargó con pN_3F o $\text{pCH}_2\text{N}_3\text{F}$ por pN_3FRS o pCNFRS .

Las 45 variantes de TAG dobles se expresaron con IgG WT como un control. Los autorradiogramas de la expresión de las variantes de IgG se mostraron en la Figura 3A y la Figura 4A. Los rendimientos de proteínas IgG de longitud completa se calcularon y se muestran en la Figura 3B y la Figura 4B. Los resultados demostraron que algunos mutantes TAG dobles podían producir tanta IgG como la secuencia WT, especialmente Y52F404.

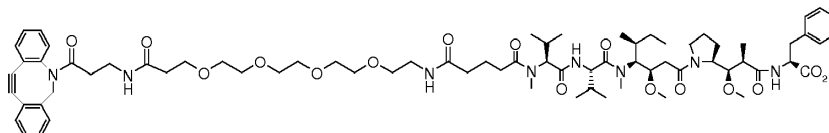
De estos, 8 mutantes TAG dobles, R19Y52, R19F404, S25F404, A40F404, Y52F404, S119F404, Y180F404 y K222F404 se seleccionaron y se subclonaron en el plásmido pYD317 para los ejemplos adicionales más abajo.

Ejemplo 3: Expresión, purificación y conjugación de variantes combinadas HC:HC

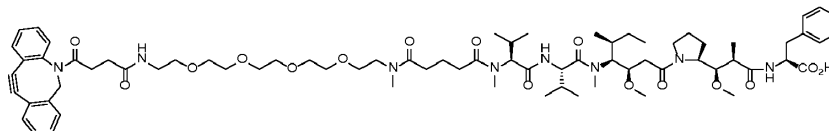
Este ejemplo proporciona la expresión, purificación y conjugación con fármaco de varias cadenas pesadas de IgG de HERCEPTIN con dos aminoácidos no naturales sitio-específicos cada una.

La mezcla de reacción libre de células en la que se sintetizaron las variantes combinadas HC:HC comprendía una mezcla 80 %:20 % de extractos libres de células preparados a partir de una cepa de *E. coli* con RF-1 atenuada sensible a OmpT, y una cepa de *E. coli* con RF-1 atenuada sensible a OmpT que se modificó para producir un ARNt ortogonal que codifica CUA para la inserción de un aminoácido no natural en un codón de parada ámbar.

Las variantes se expresaron en una reacción de síntesis de proteínas libre de células de la siguiente manera y como se describe en Zawada y otros, 2011, Biotechnol. Bioeng. 108(7):1570-1578 con las modificaciones descritas más abajo. Los extractos libres de células se trataron con yodoacetamida 50 μM durante 30 min a TA (20 °C) y se añadieron a una premezcla que contiene todos los otros componentes excepto el ADN que codifica las variantes de interés. La concentración final en la reacción de síntesis de proteína era 30 % de extracto celular, para-azido metil fenilalanina (pAzMeF) 1 mM (aminoácidos RSP), aminoacil ARNt sintetasa de *M. jannaschii* específica de pAzMeF (FRS) a 0.37 mg/ml, GSSG 2 mM, PDI a 0.29 mg/ml (Mclab), *E. coli* DsbC a 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, glutamato de magnesio 8 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de potasio 130 mM, piruvato de sodio 35 mM, AMP 1.2 mM, 0.86 mM de cada uno de GMP, UMP, y CMP, aminoácidos 2 mM (excepto 0.5 mM para tirosina y fenilalanina), oxalato de sodio 4 mM, putrescina 1 mM, espermidina 1.5 mM, fosfato de potasio 15 mM, T7 RNAP 100 nM, ADN de cadena ligera de trastuzumab 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ADN de variante de cadena pesada de trastuzumab-(His)₆ 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Después de la adición de la plantilla de ADN, las reacciones libres de células se incubaron a 30 °C durante 12 h en un agitador a 650 rpm en placas Flower (m2p-labs # MTP-48-B). Todas las variantes se escalaron hasta 9 ml en placas Flower (1.5 ml X 6 réplicas) y se purificaron usando Protein Maker (Emerald Biosystems).



DBCO-MMAF AB3627



DBCO-MMAF AB4285

Las variantes combinadas HC:HC con 4 nAA se conjugaron de la siguiente manera. DBCO-MMAF AB3627 o AB4285 (ACME Bioscience; Palo Alto, CA) se disolvió en DMSO hasta una concentración final de 5 mM. El compuesto se diluyó con PBS hasta una concentración de 1 mM y después se añadió a variantes purificadas de trastuzumab en tampón de elución de IMAC para lograr una concentración final del fármaco de 100 µM. La mezcla se incubó a TA (20 °C) durante 17 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de azida sódica a una concentración final de 100 mM y el tampón se intercambiò usando placas Zeba (Thermo Scientific; Waltham, MA) equilibradas en PBS 1X. Después el filtrado se pasó a través de una placa MUSTANG® Q (Pall Corp.; Port Washington, NY) para eliminar la endotoxina.

10 Ejemplo 4: Estabilidad térmica de conjugados anticuerpo-fármaco ilustrativos

Este ejemplo proporciona la estabilidad térmica (T_m) de conjugados de trastuzumab y trastuzumab aglicosilado.

15 El ensayo de cambio térmico se llevó a cabo mediante la mezcla de la proteína a ensayar (Sutroceptina y sus variantes) con un colorante sensible al ambiente (SYPRO Orange, Life Technologies Cat #S-6650) en una solución tamponada (PBS), y el chequeo de la fluorescencia de la mezcla en tiempo real a medida que esta experimenta desnaturalización térmica controlada. La concentración final de la proteína en la mezcla de ensayo fue entre 100-250 µg/ml, y el colorante se diluyó 1:1000 a partir de la solución de reserva original (la solución de reserva de colorante está a 5000x en DMSO). Después de dispensar alícuotas de 5 µl de la mezcla de proteína con colorante en una microplaca de 384 pocillos (Bio-Rad Cat #MSP-3852), la placa se selló con una película de sellado ópticamente transparente (Bio-Rad Cat #MSB-1001), y se colocó en un termociclador de tiempo real para placas de 384 pocillos (Bio-Rad CFX384 Real Time System). La mezcla de proteína con colorante se calentó de 25 °C a 95 °C, a incrementos de 0.1 °C por ciclo (~1.5 °C por minuto), dejando 3 segundos de equilibración a cada temperatura antes de obtener una medición de fluorescencia. Al final del experimento, la temperatura de fusión (T_m) se determinó usando el software administrador CFX de Bio-Rad.

25 Para las muestras de proteína con perfiles de transición térmica complejos, la temperatura de fusión (T_m) se calcula a partir del gráfico de derivada de primer orden negativo de la intensidad de fluorescencia (eje Y) contra temperatura (eje X), o mediante el ajuste de los datos al modelo sigmoidal de Boltzmann. La diferencia en la temperatura de fusión de las variantes de IgG en comparación con la proteína silvestre es una medida del cambio térmico para la proteína ensayada.

30 Los resultados de este ensayo para ciertas variantes se muestran en la Tabla 2. En general, las desviaciones en T_m significativamente por debajo del trastuzumab no sustituido, particularmente en T_{m1}, indican una pérdida indeseable de estabilidad y/o una tendencia a la agregación.

35 Tabla 2: Estabilidad térmica de las variantes

| Variante | Anticuerpo solamente | | Conjugado anticuerpo-fármaco | | DAR |
|------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|------|
| | T _{m1} (°C) | T _{m2} (°C) | T _{m1} (°C) | T _{m2} (°C) | |
| HC-R19/HC-Y52 | 61.6 +/- 0.1 | 74.8 +/- 0.1 | 61.6 +/- 0.1 | 71.5 +/- 0.1 | 3.76 |
| HC-R19/HC-F404 | 61.5 +/- 0 | 74.8 +/- 0.1 | 64.2 +/- 0.1 | 72.9 +/- 0.1 | 3.82 |
| HC-S25/HC-F404 | 61.6 +/- 0 | 78.2 +/- 0.1 | 64.1 +/- 0 | 76.5 +/- 0.1 | 3.75 |
| HC-A40/HC-F404 | 61.6 +/- 0.1 | 75.8 +/- 0 | 64.1 +/- 0 | 75.3 +/- 0.5 | 3.77 |
| HC-Y52/HC-F404 | 61.5 +/- 0 | 77.2 +/- 0 | 64.2 +/- 0.1 | 75.4 +/- 0.1 | 3.78 |
| HC-S 119/HC-F404 | 61.1 +/- 0.3 | 74.8 +/- 0.1 | 64.3 +/- 0.1 | 72 +/- 0.6 | 3.66 |
| HC-Y180/HC-F404 | 61.6 +/- 0.1 | 76.8 +/- 0.1 | 64.2 +/- 0.4 | 76.2 +/- 0.1 | 3.62 |
| HC-K222/HC-F404 | 61 +/- 0.6 | 77.2 +/- 0.1 | 64.2 +/- 0.1 | 76.7 +/- 0.2 | 3.74 |
| Trastuzumab-CF | 61.4 +/- 0.1 | 76.2 +/- 0.1 | | | |

Se prefieren las variantes de trastuzumab que exhiben una T_{m1} y/o T_{m2} dentro de aproximadamente 5 °C del trastuzumab no sustituido.

40 Ejemplo 5: Muerte de células SKBR3 producida por conjugados anticuerpo-fármaco ilustrativos

45 Este ejemplo demuestra que los conjugados anticuerpo-fármaco ilustrativos de los ejemplos anteriores son eficaces en un ensayo de muerte celular. Los efectos de los anticuerpos con cadena pesada-cadena pesada no natural (HC-HC) conjugados en cuatro sitios específicos, descritos anteriormente, sobre la muerte celular se midieron mediante un ensayo de proliferación celular.

Las SKBR3 se obtuvieron de la ATCC y se mantuvieron en DMEM: /nutriente F-12 de Ham (50:50), glucosa elevada (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) complementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (Hyclone;

Thermo Scientific; Waltham, MA), glutamax 2 mM (Invitrogen; Carlsbad, CA) y penicilina/estreptomicina 1x (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA). Las células adherentes se lavaron dos veces con solución salina equilibrada con fosfato (PBS) sin calcio ni magnesio, y se cosecharon con HYQ®TASE™ (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA). Un total de 3x10 células en un volumen de 40 µl se sembraron en cada pocillo de una placa de zona media de 96 pocillos de poliestireno blanco y fondo plano. Se dejó que las células se adhirieran toda la noche a 37 °C en una incubadora de CO₂. Las variantes de conjugado anticuerpo-fármaco se formularon a concentración 2x en medio DMEM/F12 y se filtraron a través de placas de filtro de 96 pocillos MultiScreen_{HTS} (Millipore; Billerica, MA). Las combinaciones de HC-HC conjugadas esterilizadas por filtración, HERCEPTIN, o trastuzumab aglicosilado se añadieron a los pocillos de tratamiento y las placas se cultivaron a 37 °C en una incubadora de CO₂ durante 120 h. Para la medición de la viabilidad celular, se añadió 80 µl de reactivo Cell Titer-Glo® (Promega Corp. Madison, WI) a cada pocillo, y las placas se procesaron de acuerdo a las instrucciones del producto. La luminiscencia relativa se midió en un lector de placas ENVISION® (Perkin-Elmer; Waltham, MA).

Las lecturas de luminiscencia relativa se convirtieron a % de viabilidad usando las células no tratadas como controles. Los datos se ajustaron con análisis de regresión no lineal, usando la ecuación de ajuste de 4 parámetros con pendiente variable para el log(inhibidor) en función de la respuesta, usando GraphPad Prism (GraphPad v 5.00, Software; San Diego, CA). Los datos se expresaron como la viabilidad celular relativa, % de contenido de ATP en función de la dosis de ADC en nM. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y la Figura 5.

Tabla 3: Muerte celular de SKBR3

| Variante | IC ₅₀ en nM de la muerte celular de SKBR3 | DAR (LCMS) |
|-----------------|--|------------|
| HC-R19/HC-Y52 | 0.18 | 3.76 |
| HC-R19/HC-F404 | 0.09 | 3.82 |
| HC-S25/HC-F404 | 0.07 | 3.75 |
| HC-A40/HC-F404 | 0.08 | 3.77 |
| HC-Y52/HC-F404 | 0.10 | 3.78 |
| HC-S119/HC-F404 | 0.07 | 3.66 |
| HC-Y180/HC-F404 | 0.06 | 3.62 |
| HC-K222/HC-F404 | 0.03 | 3.74 |
| HC-F404 | 0.23 | 1.90 |
| HC-R19 | 0.03 | 1.67 |
| HC-Y52 | 0.17 | 1.67 |
| HC-S25 | 0.16 | 1.55 |
| HC-A40 | 0.12 | 1.70 |
| HC-Y180 | 0.11 | 1.29 |
| HC-K222 | 0.08 | 1.21 |

Como se muestra en la Tabla 3, los anticuerpos conjugados con dos fármacos tuvieron una eficacia similar o mayor que los anticuerpos correspondientes conjugados a fármacos individuales en las posiciones correspondientes.

Ejemplo 6: Incorporación de dos aminoácidos no naturales diferentes en una IgG individual

Este ejemplo proporciona moléculas de IgG individuales que incorporan dos aminoácidos no naturales diferentes en posiciones sitio-específicas.

Para producir anticuerpos heteroméricos *in vivo* o *in vitro*, la cadena pesada y la cadena ligera pueden expresarse en la misma mezcla de fermentación/reacción. En la presente descripción describimos un método para prefabricar una cadena ligera y adionarla nuevamente para la expresión de la cadena pesada en el sistema de síntesis de proteínas libre de células para formar anticuerpos heteroméricos.

Para incorporar dos nnAA diferentes a IgG, se construyeron plásmidos de cadena pesada y cadena ligera con codones ámbar en sitios deseados, por ejemplo, trastuzumab LC T22, LC S63 y HC F404. El primer aminoácido no natural, nnAA1, pAzidoF se incorporó durante la síntesis de proteínas libre de células de la cadena ligera como se describe más abajo.

La mezcla de reacción libre de células en la que se sintetizaron las variantes de trastuzumab comprendía una mezcla 85 %:15 % de extractos libres de células preparados a partir de una cepa de *E. coli* con RF-1 atenuada sensible a OmpT que se modificó para sobreexpresar DsbC (extracto de DsbC), y una cepa de *E. coli* con RF-1 atenuada sensible a OmpT que se modificó para producir un ARNt ortogonal que codifica CUA (extracto de ARNt) para la inserción de un aminoácido no natural en un codón de parada ámbar. Las variantes se expresaron en una reacción de síntesis de proteínas libre de células de la siguiente manera. Los extractos libres de células se trataron con yodoacetamida 50 µM durante 30 min a TA (20 °C) y se añadieron a una premezcla que contiene todos los otros componentes excepto el ADN que codifica las variantes de interés. La concentración final en la reacción de síntesis de proteínas era 30 % de extracto celular, para-azido fenilalanina (pAzF) 2 mM (aminoácidos RSP), aminoacil ARNt sintetasa de *M jannaschii* específica de pAzF (FRS) a 0.37 mg/ml, GSSG 2 mM, glutamato de magnesio 8 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de potasio 130 mM, piruvato de sodio 35 mM, AMP 1.2 mM, 0.86 mM de cada uno de GMP, UMP, y CMP, aminoácidos 2 mM (excepto 0.5 mM para tirosina y fenilalanina), oxalato de sodio 4 mM, putrescina 1 mM, espermidina 1.5 mM, fosfato de potasio 15 mM, T7 RNAP 100 nM, y ADN de cadena ligera de trastuzumab 10 µg/ml. Después de la adición de la plantilla de ADN, las reacciones libres de células se incubaron a 30 °C durante 12 h.

Las cadenas ligeras se purificaron con columnas de proteína L. El segundo aminoácido no natural, nnAA2, pAzMeF se incorporó después a la cadena pesada en presencia de cadena ligera prefabricada que contiene pAzF usando la misma condición descrita anteriormente excepto que el par de sintetasa y nnAA cambió a aminoacil ARNt sintetasa de *M jannaschii* específica de pAzMeF y pAzMeF. Se añadieron ADN de cadena pesada F404 de trastuzumab a 10 µg/ml y LC prefabricada a 400 µg/ml.

Este proceso da como resultado una IgG ensamblada que tiene pAzF en la cadena ligera y pAzMeF en la cadena pesada como se muestra en la Figura 6. Alternativamente, puede incorporarse, además, pAzMeF a la cadena ligera e incorporarse pAzF a la cadena pesada.

Usando este enfoque, cualquiera de dos nnAA diferentes puede incorporarse en una IgG individual. Diferentes químicas pueden usarse para conjugar diferentes fármacos con IgG en sitios específicos. Dos conjugaciones ortogonales pueden hacerse en la misma reacción.

Ejemplo 7: Una IgG individual conjugada con dos cargas útiles diferentes

Este ejemplo proporciona una IgG individual conjugada con dos fracciones de carga útil diferentes. Una cadena ligera con un primer nnAA se expresa, se purifica y después se conjuga con un primer fármaco. Un segundo nnAA (igual o diferente) se incorpora después a una cadena pesada en presencia de LC conjugada. La IgG generada tiene un fármaco en la cadena ligera y un sitio en la cadena pesada disponible para una segunda conjugación. El proceso se esboza en la Figura 7.

En este ejemplo, una cadena ligera se conjuga a un fármaco, monometil auristatina F (MMAF) y una cadena pesada se conjuga a otro fármaco, SN38.

pAzF se incorporó a la LC en T22 o S63 de acuerdo con el ejemplo anterior. Después la LC se purificó y se incubó con MMAF a una relación molar 1 a 5 a temperatura ambiente durante 16 horas. pAzMeF se incorporó a la HC en la posición F404 en presencia de LC conjugada a 400 µg/ml. La condición de reacción fue la misma que se describió en el ejemplo anterior. Después la IgG se purificó por columna de proteína A.

La IgG purificada se conjugó con el segundo fármaco, SN38, después de la purificación. IgG 5 µM y SN38 25 µM se incubaron a temperatura ambiente durante 16 horas para generar el ADC. Se confirmó la presencia de dos MMAF en LC y dos SN38 en HC en este ADC por análisis de espectrometría de masas como se proporciona en la Figura 8A (T22 pAzF) y la Figura 8B (S63 pAzF).

Ejemplo 8: Incorporación de aminoácidos no naturales en cadenas pesadas y cadenas ligeras

Este ejemplo demuestra cadenas pesadas que incorporan al menos un aminoácido no natural, cadenas ligeras que incorporan al menos un aminoácido no natural, y anticuerpos con las cadenas pesadas y las cadenas ligeras. Los anticuerpos resultantes tienen al menos cuatro aminoácidos no naturales en ubicaciones sitio-específicas. La Tabla 4 proporciona los sitios para los aminoácidos no naturales en las cadenas pesadas y las cadenas ligeras.

Tabla 4

| | LC-T22 | LC-S7 |
|---------|----------------|---------------|
| HC-S70 | HC-S70/LC-T22 | HC-S70/LC-S7 |
| HC-K121 | HC-K121/LC-T22 | HC-K121/LC-S7 |
| HC-S136 | HC-S136/LC-T22 | HC-S136/LC-S7 |

| | LC-T22 | LC-S7 |
|---------|----------------|---------------|
| HC-Y180 | HC-Y180/LC-T22 | HC-Y180/LC-S7 |
| HC-S190 | HC-S190/LC-T22 | HC-S190/LC-S7 |
| HC-F404 | HC-F404/LC-T22 | HC-F404/LC-S7 |

5 Para demostrar la factibilidad de producir anticuerpos y conjugados anticuerpo-fármaco con al menos cuatro aminoácidos no naturales sitio-específicos, los ADN que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de trastuzumab con ámbar se clonaron por separado en el vector de expresión pYD317. El codón TAG se insertó mediante mutagénesis por PCR de cebadores superpuestos en los nucleótidos correspondientes al aminoácido serina en las posiciones S136, Y180, S190, y F404 en la cadena pesada, y S7 y T22 en la cadena ligera. Para incorporar cuatro pAzMeF en una IgG, la concentración de pCNFRS se aumentó en aproximadamente el doble.

10 La mezcla de reacción libre de células en la que se sintetizaron las variantes combinadas de HC/LC era una mezcla 80 %:20 % de extractos libres de células preparados a partir de una cepa de *E. coli* con RF-1 atenuada sensible a OmpT, y una cepa de *E. coli* con RF-1 atenuada sensible a OmpT que se modificó para producir un ARNt ortogonal que codifica CUA para la inserción de un aminoácido no natural en un codón de parada ámbar. Las variantes se expresaron en una reacción de síntesis de proteínas libre de células de la siguiente manera (en base al método descrito en Zawada y otros, 15 2011, Biotechnol. Bioeng. 108(7)1570-1578) con las modificaciones descritas más abajo.

Los extractos libres de células se trataron con yodoacetamida 50 μ M durante 30 min a TA (20 °C) y se añadieron a una premezcla que contiene todos los otros componentes excepto el ADN que codifica las variantes de interés. La concentración final en la reacción de síntesis de proteínas era 30 % de extracto celular, para-azido metil fenilalanina (pAzMeF) 1 mM (aminoácidos RSP), aminoacil ARNt sintetasa de *M. jannaschii* específica de pAzMeF (FRS) a 0.37 mg/ml, GSSG 2 mM, PDI (Mclab) a 0.29 mg/ml, *E. coli* DsbC a 30 μ g/ml, glutamato de magnesio 8 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de potasio 130 mM, piruvato de sodio 35 mM, AMP 1.2 mM, 0.86 mM de cada uno de GMP, UMP, y CMP, aminoácidos 2 mM (excepto 0.5 mM para tirosina y fenilalanina), oxalato de sodio 4 mM, putrescina 1 mM, espermidina 1.5 mM, fosfato de potasio 15 mM, T7 RNAP 100 nM, ADN de variante de cadena ligera de trastuzumab 2.5 μ g/ml, ADN de variante de cadena pesada de trastuzumab-(His)₆ 7.5 μ g/ml. Después de la adición de la plantilla de ADN, las reacciones libres de células se incubaron a 30 °C durante 12 h en un agitador a 650 rpm en placas Flower (m2p-labs # MTP-48-B). Todas las variantes se escalaron hasta 9 ml en placas Flower (1.5 ml X 6 réplicas) y se purificaron usando Protein Maker.

30 Ejemplo 9: Purificación de variantes de trastuzumab aglicosilado con 4 nnAA

Los anticuerpos con cuatro aminoácidos no naturales sitio-específicos en las cadenas pesadas y las cadenas ligeras (combinaciones de HC /LC con 4nnAA) se purificaron con el siguiente procedimiento en tres etapas:

35 Captura de IgG: Para capturar la IgG, se diluyeron en primer lugar 8 ml del crudo libre de células para cada variante 1:0.5 con tampón de equilibrio (fosfato de sodio 50 mM, pH 7) y se centrifugaron a 11,000xg durante 30 minutos. Después el sobrenadante se pasó a través de un filtro de 0.45 micras en jeringa antes de cargarlo con un tiempo de residencia de 2 minutos en una columna MabSelect Sure HiTrap de 1 ml (GE Lifesciences) preequilibrada. Después la columna se lavó con 7.5 CV (volúmenes de columna) de tampón de lavado (fosfato de sodio 100 mM y arginina 800 mM, pH 7) seguido de 7.5 CV de tampón de equilibrio. Después cada variante se eluyó con 4 CV de tampón de elución (citrato de sodio 100 mM y arginina 300 mM, pH 3). El grupo de elución se ajustó a pH 4.6 mediante la adición de 20 % (v/v) de Tris 1 M, pH 9.

45 Eliminación de agregados: Para eliminar las impurezas asociadas al producto, los 4.8 ml de IgG purificada por MabSelect se pasaron a través de una columna Capto Adhere HiTrap de 1 ml (GE Lifesciences) que se había equilibrado previamente con citrato de sodio 83.3 mM, Tris 167 mM, arginina 250 mM, pH 4.6. Después la columna se lavó con unos 7.5 CV adicionales del mismo tampón. El flujo pasante y el lavado se recolectaron y se neutralizaron a pH 7 mediante la adición de 10 % (v/v) de Tris 1 M, pH 9.

50 Intercambio de tampón: El grupo purificado por Capto Adhere que se recolectó se concentró y el intercambio de tampón a PBS se realizó usando la unidad de filtración por centrifugación Amicon Ultra-15 (Millipore) mediante la dilución repetida con PBS y posterior concentración.

55 Ejemplo 10: Conjugación de variantes de trastuzumab aglicosilado con MMAF

Este ejemplo proporciona la conjugación de los anticuerpos con al menos cuatro aminoácidos no naturales sitio-específicos a la fracción MMAF útil.

Las variantes combinadas de HC/LC con 4 nnAA purificadas se conjugaron de la siguiente manera. DBCO-MMAF

AB3627 o AB4285 (ACME Bioscience; Palo Alto, CA), mostrados anteriormente, se disolvieron en DMSO hasta una concentración final de 5 mM. Los compuestos se diluyeron con PBS hasta una concentración de 1 mM y después se añadieron a las variantes de trastuzumab purificadas en un tampón de elución para cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC) para lograr una concentración final de fármaco de 100 µM. La mezcla se incubó a TA (20 °C) durante 17 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de azida sódica a una concentración final de 100 mM y el tampón se intercambiò usando placas Zeba (Thermo Scientific; Waltham, MA) equilibradas en PBS 1X. Después el filtrado se pasó a través de una placa MUSTANG® Q (Pall Corp.; Port Washington, NY) para eliminar la endotoxina.

10 Ejemplo 11: Estabilidad térmica de conjugados anticuerpo-fármaco ilustrativos

Este ejemplo proporciona la estabilidad térmica (T_m) de trastuzumab aglicosilado y variantes de trastuzumab.

15 El ensayo de cambio térmico se llevó a cabo mediante la mezcla de la proteína a ensayar (Sutroceptina y sus variantes) con un colorante sensible al ambiente (SYPRO Orange, Life Technologies Cat #S-6650) en una solución tamponada (PBS), y el chequeo de la fluorescencia de la mezcla en tiempo real a medida que esta experimenta desnaturalización térmica controlada. La concentración final de la proteína en la mezcla de ensayo fue entre 100-250 µg/ml, y el colorante se diluyó 1:1000 a partir de la solución de reserva original (la solución de reserva de colorante está a 5000x en DMSO). Después de dispensar alícuotas de 5 µl de la mezcla de proteína con colorante en una microplaca de 384 pocillos (Bio-Rad Cat #MSP-3852), la placa se selló con una película de sellado ópticamente transparente (Bio-Rad Cat #MSB-1001), y se colocó en un termociclador de tiempo real para placas de 384 pocillos (Bio-Rad CFX384 Real Time System). La mezcla de proteína con colorante se calentó de 25 °C a 95 °C, a incrementos de 0.1 °C por ciclo (~1.5 °C por minuto), dejando 3 segundos de equilibración a cada temperatura antes de obtener una medición de fluorescencia. Al final del experimento, la temperatura de fusión (T_m) se determinó usando el software administrador CFX de Bio-Rad. Para las muestras de proteína con perfiles de transición térmica complejos, la temperatura de fusión (T_m) se calcula a partir del gráfico de derivada de primer orden negativo de la intensidad de fluorescencia (eje Y) contra temperatura (eje X), o mediante el ajuste de los datos al modelo sigmoidal de Boltzmann. La diferencia en la temperatura de fusión de las variantes de IgG en comparación con la proteína silvestre es una medida del cambio térmico para la proteína ensayada.

25 La Tabla 5 proporciona las estabilidades térmicas para los anticuerpos con aminoácidos no naturales sitio-específicos en sus cadenas pesadas y en sus cadenas ligeras. La Tabla 6 proporciona las estabilidades térmicas para los anticuerpos correspondientes que tienen aminoácidos no naturales sitio-específicos simples en las cadenas ligeras o cadenas pesadas. En general, las desviaciones en T_m significativamente por debajo de trastuzumab no incorporado, particularmente en T_m1, indican una pérdida indeseable de estabilidad y/o una tendencia a la agregación.

35 Tabla 5

| Variante | Anticuerpo solamente | | Conjugado anticuerpo-fármaco | | DAR |
|----------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|-----|
| | T _m 1 (°C) | T _m 2 (°C) | T _m 1 (°C) | T _m 2 (°C) | |
| HC-S136/LC-S7 | 61.7 +/- 0.1 | 76.5 +/- 0 | 61 +/- 0 | 75.1 +/- 0.1 | 3.7 |
| HC-F404/LC-S7 | 61.9 +/- 0 | 76.6 +/- 0.1 | 64.4 +/- 0.1 | 75.7 +/- 0.2 | 3.8 |
| HC-S190/LC-S7 | 61.9 +/- 0 | 76.7 +/- 0.1 | 61.1 +/- 0.1 | 75.8 +/- 0 | 3.6 |
| HC-Y180/LC-S7 | 61.9 +/- 0.1 | 76.2 +/- 0.1 | 61.9 +/- 0.1 | 75.1 +/- 0.1 | 3.7 |
| HC-K121/LC-S7 | 61.8 +/- 0.2 | 74.9 +/- 0.1 | 61.3 +/- 0.6 | 72.3 +/- 0.1 | 3.7 |
| HC-S70/LC-S7 | 61.9 +/- 0 | 76.1 +/- 0.1 | 61.9 +/- 0.1 | 73 +/- 0.5 | 3.7 |
| HC-S136/LC-T22 | 61.1 +/- 0 | 76.3 +/- 0.1 | 60.3 +/- 1.2 | 75.1 +/- 0.1 | 3.7 |
| HC-F404/LC-T22 | 61.7 +/- 0.2 | 76.5 +/- 0 | 64.4 +/- 0.2 | 75.8 +/- 0.1 | 4.0 |
| HC-S190/LC-T22 | 61.9 +/- 0.1 | 76.5 +/- 0.1 | 61.1 +/- 0.1 | 75.6 +/- 0.2 | 3.6 |
| HC-Y180/LC-T22 | 61.9 +/- 0 | 76.1 +/- 0.1 | 61.9 +/- 0 | 75.1 +/- 0 | 3.7 |
| HC-K121/LC-T22 | 61.9 +/- 0.1 | 74.9 +/- 0.1 | 61.9 +/- 0.1 | 72.4 +/- 0.1 | 3.7 |
| HC-S70/LC-T22 | 61.8 +/- 0.1 | 76 +/- 0.1 | 61.9 +/- 0 | 73.4 +/- 0.1 | 3.7 |
| Trastuzumab-CF | 61.4 +/- 0.1 | 76.2 +/- 0.1 | | | |

Tabla 6

| Variante | Anticuerpo solamente | | Conjugado anticuerpo-fármaco | | DAR |
|----------------|----------------------|--------------|------------------------------|--------------|------|
| | Tm1 (°C) | Tm2 (°C) | Tm1 (°C) | Tm2 (°C) | |
| HC-S136 | 61.4 +/- 0.1 | 76.7 +/- 0.2 | 61.1 +/- 0.2 | 76.3 +/- 0 | 1.51 |
| HC-F404 | 61.2 +/- 0.2 | 76.6 +/- 0.1 | 63.5 +/- 0.4 | 76.5 +/- 0.1 | 1.97 |
| HC-S190 | 61.5 +/- 0.2 | 77.2 +/- 0.1 | 59.2 +/- 0 | 77 +/- 0.1 | 1.31 |
| HC-Y180 | 61.4 +/- 0.1 | 76.2 +/- 0 | 61.6 +/- 0.3 | 75.4 +/- 0.6 | 1.38 |
| LC-S7 | 62 +/- 0.1 | 76.9 +/- 0 | 60.7 +/- 0.1 | 76.2 +/- 0 | 1.50 |
| LC-T22 | 61.7 +/- 0 | 76.8 +/- 0 | 61.6 +/- 0.2 | 76.4 +/- 0.1 | 1.50 |
| HC-K121 | 61.4 | 75.1 | 61.4 | 74.7 | 1.6 |
| HC-S70 | 61.6 | 77.8 | 61.5 | 76.2 | 1.62 |
| Trastuzumab-CF | 61.4 +/- 0.1 | 76.2 +/- 0.1 | | | |

Como se muestra en la Tabla 5, los anticuerpos de este ejemplo tenían estabilidades ventajosas. Por ejemplo, cualquier conjugado anticuerpo-fármaco con la mutación F404 tiene una Tm1 que es ~3 °C mayor que la del anticuerpo no conjugado, lo que indica que la conjugación del fármaco en este sitio confiere mayor termoestabilidad al andamio.

Ejemplo 12: Relación fármaco-anticuerpo de conjugados de fármaco con anticuerpo aglicosilado que tiene cuatro aminoácidos no naturales sitio-específicos

Este ejemplo proporciona la eficiencia de la conjugación de los anticuerpos anteriores con cuatro aminoácidos no naturales sitio-específicos. La eficiencia de la conjugación se mide como la relación de fármacos respecto al anticuerpo. Las relaciones se midieron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y por ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

Las muestras se corrieron en un sistema Waters Aquity UPLC unido a un Xevo QTOF. Las proteínas se separaron en una columna Agilent PLRP-S (2.3 x 50 mm, 5 µm, 4000 Å) a 80 °C. Fases móviles: A: 0.1 % de ácido fórmico en agua; B: 20:80 isopropanol:acetonitrilo, 0.1 % de ácido fórmico. Las muestras se desalaron en columna durante 0.4 minutos a 10 % de B seguido por un gradiente en etapas de 30 % de B a 40 % de B durante 7 minutos, 40 % de B a 60 % de B durante 3 minutos. Los datos se obtuvieron respecto a la elución de LC total usando un voltaje de cono de 35 V. Los espectros se analizaron usando el software MassLynx. Los valores de DAR se calcularon como un promedio ponderado usando la intensidad máxima de los picos coincidentes en los espectros deconvolucionados. Cuando no se observó un pico definido se usó la intensidad inicial para la masa teórica del conjugado en el cálculo de DAR. Los ejemplos de espectros se muestran en las Figuras 9A-9H.

La eficiencia de la conjugación con fármaco de las combinaciones de HC-HL con 4nnAA se evaluó, además, mediante un método de ELISA doble que mide la IgG total y los conjugados de fármaco totales. La IgG total se determinó por ELISA usando Her2-ECD como sustrato de recubrimiento e IgG de carnero antihumano conjugada a HRP (específica de Fc) para la detección. Los conjugados de fármaco totales se midieron por ELISA usando el mismo sustrato de recubrimiento y se detectaron con anticuerpo de conejo anti-MMAF e IgG de carnero anticonejo conjugada a HRP (específica de Fc). La eficiencia de la conjugación con fármaco se expresa como OD de ELISA de MMAF por ng/ml de IgG total y se proporciona en la Figura 10.

Los resultados se resumen en las Tablas 5 y 6, anteriores.

Ejemplo 13: Muerte celular de SKBR3 con anticuerpos aglicosilados con 2 nnAA y 4 nnAA

Los efectos de las combinaciones de HC-LC con 4 nnAA conjugados sobre la muerte celular se midieron mediante un ensayo de proliferación celular.

Las SKBR3 se obtuvieron de la ATCC y se mantuvieron en DMEM: /nutriente F-12 de Ham (50:50), glucosa elevada (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) complementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA), glutamax 2 mM (Invitrogen; Carlsbad, CA) y penicilina/estreptomina 1x (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA). Las células adherentes se lavaron dos veces con solución salina equilibrada con fosfato (PBS) sin calcio ni magnesio, y se cosecharon con HYQ®TASE™ (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA). Un total de 3x10³ células en un volumen de 40 µl se sembraron en cada pocillo de una placa de zona media de 96 pocillos de poliestireno blanco y fondo plano. Se dejó que las células se adhirieran toda la noche a 37 °C en una incubadora de CO₂. Las variantes de ADC se formularon a concentración 2x en medio DMEM/F12 y se filtraron a través de placas de

5 filtro de 96 pocillos MultiScreen_{HTS} (Millipore; Billerica, MA). Las variantes de ADC aglicosilados conjugados con 2nnAA y 4nnAA esterilizadas por filtración, trastuzumab, o trastuzumab aglicosilado se añadieron a los pocillos de tratamiento y las placas se cultivaron a 37 °C en una incubadora de CO₂ durante 120 h. Para la medición de la viabilidad celular, se añadió 80 µl de reactivo Cell Titer-Glo® (Promega Corp.; Madison, WI) a cada pocillo, y las placas se procesaron de acuerdo a las instrucciones del producto. La luminiscencia relativa se midió en un lector de placas ENVISION® (Perkin-Elmer; Waltham, MA). Las lecturas de luminiscencia relativa se convirtieron a % de viabilidad usando células no tratadas como controles. Los datos se ajustaron con análisis de regresión no lineal, usando la ecuación de ajuste de 4 parámetros con pendiente variable para el log(inhibidor) en función de la respuesta, usando GraphPad Prism (GraphPad v 5.00, Software; San Diego, CA). Los datos se expresaron como la viabilidad celular relativa, % de contenido de ATP en función de la dosis de ADC en nM. Los resultados de la actividad de muerte celular se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

| 2nnAA y 4nnAA, Variantes | Muerte celular de SKBR3 | DAR (LCMS) |
|--------------------------|-------------------------|------------|
| Variante | IC50, nM | DAR |
| HC S136/ LC S7 | 0.07 | 3.67 |
| HC F404/ LC S7 | 0.07 | 3.81 |
| HC S190/ LC S7 | 0.08 | 3.63 |
| HC Y180/ LC S7 | 0.08 | 3.65 |
| HC K121/LC S7 | 0.08 | 3.71 |
| HC S70/ LC S7 | 0.07 | 3.67 |
| HC S136/ LC T22 | 0.09 | 3.67 |
| HC F404/ LC T22 | 0.07 | 3.98 |
| HC S190/ LC T22 | 0.09 | 3.65 |
| HC Y180/ LC T22 | 0.09 | 3.68 |
| HC K121/LC T22 | 0.08 | 3.69 |
| HC S70/LC T 22 | 0.1 | 3.66 |
| HC K121 | 0.13 | 1.56 |
| HC S70 | 0.11 | 1.53 |
| HC-S136 | 0.05 | 1.56 |
| HC-F404 | 0.23 | 1.91 |
| HC-Y180 | 0.11 | 1.38 |
| HC-Y190 | NA | 1.3 |
| LC-S7 | 0.110 | 1.51 |
| LCT22 | 0.13 | 1.7 |

15 Ejemplo 14: Estudio de eficacia *in vivo* con modelo de tumor ortotópico de cáncer de mama KPL-4

Este ejemplo demuestra que varios anticuerpos con dos o cuatro aminoácidos no naturales sitio-específicos conjugados con fracciones de fármaco son eficaces para causar la regresión del tumor en un modelo *in vivo*.

20 Se inocularon células KPL-4 de tumor de mama humano en las almohadillas de grasa mamarias de ratones SCID grises (Charles River Laboratories). Se inyectó un total de 3 millones de células por ratón, suspendidas en 50 % de Matrigel libre de fenol rojo (Becton Dickinson Bioscience) mezclado con medio de cultivo. Cuando se alcanzó el tamaño tumoral todos los animales se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento, de manera que el volumen tumoral promedio para cada grupo fuera 100 - 150 mm³.

25 El trastuzumab (30 mg/kg) se administró por vía i.p. (una sola inyección en el día de tratamiento 0), seguido de (15 mg/kg) por semana durante 3 semanas. La variante de trastuzumab aglicosilado con 2nnAA HC-S136 AB4285 (15 mg/kg) DAR 1.840, 586 µg de MMAF/m², la variante de trastuzumab aglicosilado con 4nnAA HC-S136/LC-S7 AB4285 DAR 3.231, 1012 µg de MMAF/m² (15 mg/kg) y la variante de trastuzumab aglicosilado con 2nnAA HC-S136 (15 mg/kg) (no conjugado) se administraron por vía i.v. (una sola inyección en el día de tratamiento 0). El vehículo (PBS) y el fármaco libre (0.54 mg/kg) se administraron por vía i.v. (una sola inyección en el día de tratamiento 0). Todos los grupos

de tratamiento consistían en 10 animales por grupo, y el tamaño tumoral se chequeó dos veces por semana usando la medición con calibre. Los ratones se alojaron en jaulas microaisladoras estándar para roedores. Los controles ambientales para las habitaciones de los animales se ajustaron para mantener una temperatura de 70 °F, una humedad relativa de 40 % a 60 %, y un ciclo aproximado de 14 h de luz/10 h de oscuridad.

La eficacia *in vivo* de ADC aglicosilados con 4 nnAA en modelos de tumor de mama sensible a trastuzumab se muestra en la Figura 11. Las células KPL-4 de cáncer de mama humano cultivadas como tumores en ratones SCID grises mostraron regresión después de una sola inyección por vía i.v. de HC-S136/LC-S7 AB4285 (15 mg/kg) en comparación con HC-S136 AB4275, vehículo, fármaco libre (0.58 mg/kg) y HCS136 no conjugado.

Ejemplo 15: Farmacocinética de Trastuzumab-CF HC-S136/LC-S7 DBCO MMAF2

Este ejemplo proporciona la farmacocinética *in vivo* de un anticuerpo con cuatro aminoácidos no naturales sitio-específicos conjugados con fracciones de fármaco.

Los ratones recibieron dosis de 2 mg/kg de trastuzumab-CF HC -S136/LC-S7 DBCO MMAF2 por vía intravenosa y las muestras de sangre se recolectaron en puntos de tiempo seleccionados: 5 min, 30 min, 1 h, 6 h, d 1, d 2, d 3, d 7, d 14, d 21 de un total de 28 días después de administrar la dosis para la preparación de plasma. Se extrajo sangre de un total de 3 ratones por cada punto de tiempo y el promedio de los 3 animales se usó para el análisis farmacocinético.

Se usaron dos enfoques para el análisis farmacocinético, un enfoque no compartimentado y un enfoque de modelación bicompartimentado, en ambos casos usando WinNonlin 'v' 5.2 (Pharsight, CA). Para el primero se calculó el área bajo la curva (AUC) usando la regla trapezoidal lineal para la porción ascendente de la curva y la regla trapezoidal logarítmica para la porción descendente. La vida media terminal se determinó a partir de una regresión del log de la concentración plasmática en función del tiempo. El número de puntos usados para la regresión, como se determina por inspección visual de los datos, fue el de los tres puntos de tiempo terminales. Para el enfoque compartimentado, se seleccionó un modelo de 2 compartimentos, una vez más siguiendo la inspección visual del perfil plasmático (Figura 12), con WinNonlin para el cálculo de los estimados iniciales. El ajuste usó los mínimos cuadrados iterativos con una rutina de minimización de Gauss-Newton y una ponderación $1/Y^2$. Los parámetros usados para ajustar los dos enfoques farmacocinéticos se describen en la Tabla 8 y el ajuste de los datos a un modelo de 2 compartimentos en la Figura 13. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos de los dos análisis se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8:

| Ajuste de los datos de trastuzumab-CF HC-S136/LC-S7 DBCO MMAF2 intravenoso después de una dosis intravenosa de 2 mg/kg para ratones usando un modelo de 2 compartimentos | | |
|--|--------------------|------------------|
| Parámetro | No compartimentado | 2 compartimentos |
| Co (µg/ml) | 36.7 | 35.0 |
| AUC _∞ (µg*h/ml) | 3983.3 | 3954.4 |
| t _{1/2} inicial (h) | NC | 3.1 |
| t _{1/2} terminal (h) | 248.3 | 177.3 |
| Depuración (ml/h/kg) | 0.502 | 0.506 |
| V _{ss} : Volumen de distribución en estado estacionario (ml/kg) | 141.2 | 126.5 |

Ejemplo 16: Estabilidad *in vivo* de conjugados de ADC con fármaco unido por enlazador

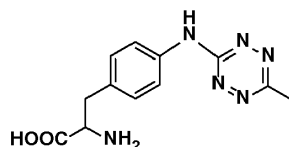
Este ejemplo proporciona la estabilidad *in vivo* de un anticuerpo con cuatro aminoácidos no naturales sitio-específicos enlazados a fracciones de fármaco. Las cantidades de anticuerpos circulantes se estimaron por captura de afinidad y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LCMS).

La estabilidad *in vivo* de conjugados de ADC con fármaco unidos por enlazador se midió mediante la administración de una dosis de 2 mg/kg de los conjugados de trastuzumab-CF HC -S136/LC-S7 DBCO-MMAF 2 respectivos a ratones Xid desnudos grises. El plasma se recolectó mediante extracciones de sangre terminales a 5 min, 30 min, 1 h, 6 h, d 1, d 2, d 3, d 7, d 14, d 21 a 28 días de n=3 animales por cada punto de tiempo. El trastuzumab-CF HC -S136/LC-S7 DBCO-MMAF 2 circulante total se capturó a partir de muestras de plasma de 30 min, d 3, d 7 y d 14 con IgG de carnero antihumano Biotina-(Fab)₂, específica de fragmento Fcγ. El complejo se arrastró con Mag Sepharose cargada con estreptavidina. El complejo capturado se lavó para eliminar la unión no específica y se eluyó con ácido fórmico al 1 %. El eluato neutralizado se analizó mediante LCMS de muestra intacta.

Los resultados indican que trastuzumab-CF HC -S 136/LC-S7 DBCO-MMAF 2 es estable hasta catorce días como se muestra en la Figura 14.

5 Ejemplo 17: Incorporación de grupos funcionales de tetrazina y azida en un anticuerpo IgG

Este ejemplo demuestra la incorporación de dos aminoácidos no naturales (nnAA) en un anticuerpo parental trastuzumab. Los nnAA se incorporaron en el anticuerpo mediante la colocación de un codón ámbar en la posición deseada para la incorporación de nnAA en un plásmido que codifica la cadena pesada de trastuzumab y en un plásmido que codifica una cadena ligera de trastuzumab. El nnAA1, para-azido-metil fenilalanina (pAMF) se incorporó en la posición S7 de la cadena ligera de trastuzumab. El nnAA2T, un aminoácido que contiene tetrazina de la siguiente fórmula, se incorporó en la posición F404 de la cadena pesada de trastuzumab:



nnAA2T

15 Tanto la cadena pesada como la cadena ligera se sintetizaron mediante la síntesis de proteínas libre de células. La cadena ligera se sintetizó primero. La mezcla de reacción libre de células comprendía una mezcla 85 %:15 % de extractos libres de células preparados a partir de una cepa de *E. coli* con RF-1 atenuada sensible a OmpT que se modificó para sobreexpresar DsbC (extracto de DsbC), y una cepa de *E. coli* con RF-1 atenuada sensible a OmpT que se modificó para producir un ARNt ortogonal que codifica CUA (extracto de ARNt) para la inserción de un aminoácido no natural en un codón de parada ámbar. Los extractos libres de células se trataron con yodoacetamida 50 μ M durante 30 min a TA (20 °C) y se añadieron a una premezcla que contiene todos los otros componentes excepto el ADN que codifica la variante de cadena ligera. La concentración final en la reacción de síntesis de proteínas era 30 % de extracto celular, pAMF 2 mM (aminoácidos RSP), aminoacil ARNt sintetasa específica de pAzMeF (FRS) a 0.37 mg/ml, glutatión oxidado (GSSG) 2 mM, glutamato de magnesio 8 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de potasio 130 mM, piruvato de sodio 35 mM, AMP 1.2 mM, 0.86 mM de cada uno de GMP, UMP, y CMP, aminoácidos 2 mM (excepto 0.5 mM para tirosina y fenilalanina), oxalato de sodio 4 mM, putrescina 1 mM, espermidina 1.5 mM, fosfato de potasio 15 mM, ARN polimerasa T7 100 nM, y ADN de variante de cadena ligera de trastuzumab 10 μ g/ml. La FRS era la aminoacil ARNt sintetasa específica de p-cianofenilalanina descrita en Young y otros, *Biochem.*, 2011, 50:1894-1900. Después de la adición de la plantilla de ADN, las reacciones libres de células se incubaron a 30 °C durante 12 h. Las cadenas ligeras sintetizadas se purificaron con una columna de proteína L.

El segundo nnAA, nnAA2T, se incorporó en la cadena pesada en presencia de cadena ligera prefabricada que contiene pAMF, usando las mismas condiciones de reacción descritas anteriormente, con los cambios siguientes: el nnAA se cambió a nnAA2T; la sintetasa se cambió a una aminoacil ARNt sintetasa específica de nnAA2T; y la reacción se realizó en presencia de 10 μ g/ml de ADN que codifica la cadena pesada de trastuzumab con un codón de parada ámbar en la posición F404 y 500 μ g/ml de LC prefabricada. La aminoacil ARNt sintetasa usada en esta reacción era la mtaF sintetasa descrita en Seitchik y otros, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134:2898-2901. La autorradiografía (Figura 15) sugiere que se produjo aproximadamente 1 mg/ml de IgG que contiene dos nnAA.

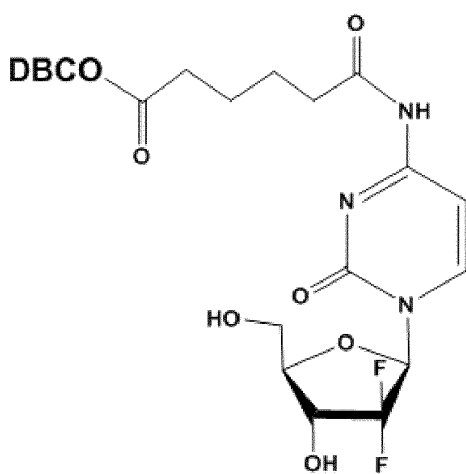
Este ejemplo demuestra la producción de IgG ensamblada que tiene pAMF en la cadena ligera y un aminoácido (nnAA2) que contiene tetrazina en la cadena pesada. Alternativamente, puede incorporarse un aminoácido que contiene tetrazina en la cadena ligera y un aminoácido que contiene azida en la cadena pesada mediante la sustitución del aminoácido apropiado y la aminoacil ARNt sintetasa durante la transcripción y traducción de cada plantilla de ADN. Adicionalmente, este enfoque puede usarse con cualquiera de los nnAA conocidos en la técnica o descritos en la presente descripción. El experto en la técnica reconocerá, además, que la incorporación de múltiples nnAA puede lograrse en una sola reacción usando ARNt ortogonales.

50 Ejemplo 18: Conjugación de dos cargas útiles diferentes a una IgG en una reacción en un único recipiente

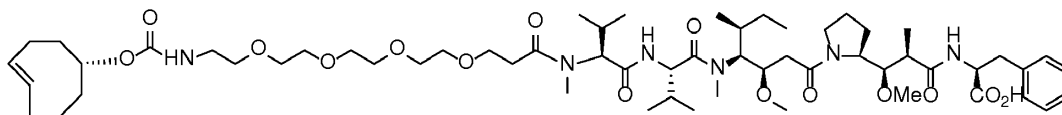
Como se describe a lo largo de esta descripción, los anticuerpos que comprenden más de un nnAA (por ejemplo, los anticuerpos del Ejemplo 17) permiten químicas reactivas ortogonales que posibilitan la conjugación simultánea de fracciones que comprenden grupos funcionales diferentes al anticuerpo en una reacción en un único recipiente.

55 La Figura 16 proporciona una visión general de un proceso de producción de anticuerpos que comprenden dos nnAA diferentes, seguido de conjugación con dos fármacos ("cargas útiles"). Como se describió en el Ejemplo 17, se sintetiza una cadena ligera que comprende nnAA1 (Figura 16, parte superior), seguido de la síntesis de una cadena pesada que comprende nnAA2 en presencia de la cadena ligera, y el ensamblaje del anticuerpo que presenta dos grupos reactivos

- 5 ortogonales portados por los dos nnAA (Figura 16, parte media). Después los grupos reactivos ortogonales se conjugan con dos fármacos diferentes en una mezcla de reacción en un único recipiente, lo que produce un producto que comprende un conjugado de anticuerpo con los dos fármacos (Figura 16, parte inferior). Como se representa en el panel inferior de la Figura 16, la naturaleza tetramérica del anticuerpo significa que el anticuerpo puede contener dos moléculas de cada fármaco, si cada cadena pesada y cada cadena ligera comprende un nnAA. El experto en la técnica reconocerá fácilmente que la cantidad de fármaco conjugado con el anticuerpo puede titularse mediante el aumento o la disminución del número de nnAA por cadena de anticuerpo, o mediante la mezcla de cadenas de anticuerpos que comprenden nnAA con cadenas de anticuerpos que comprenden solamente residuos de aminoácidos de origen natural.
- 10 Tres combinaciones de fármacos en cinco esquemas diferentes se probaron en reacciones de síntesis en un único recipiente. En las reacciones, IgG que contiene pAMF y nnAA2T 2 μ M, DBCO-carga útil 10 μ M y TCO-carga útil 10 μ M se mezclaron en tampón PBS. La reacción de conjugación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 12 horas.
- 15 La combinación 1 fue DBCO-gemcitabina (más abajo, reacciona con azida) en combinación con *trans*-cicloocteno-MMAF (TCO-MMAF) (más abajo, reacciona con tetrazina):



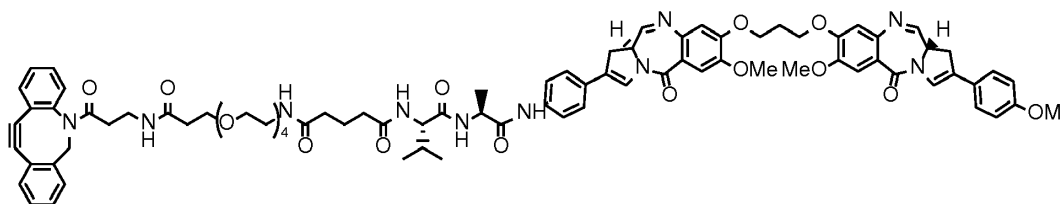
DBCO-Gemcitabina



TCO-MMAF

20

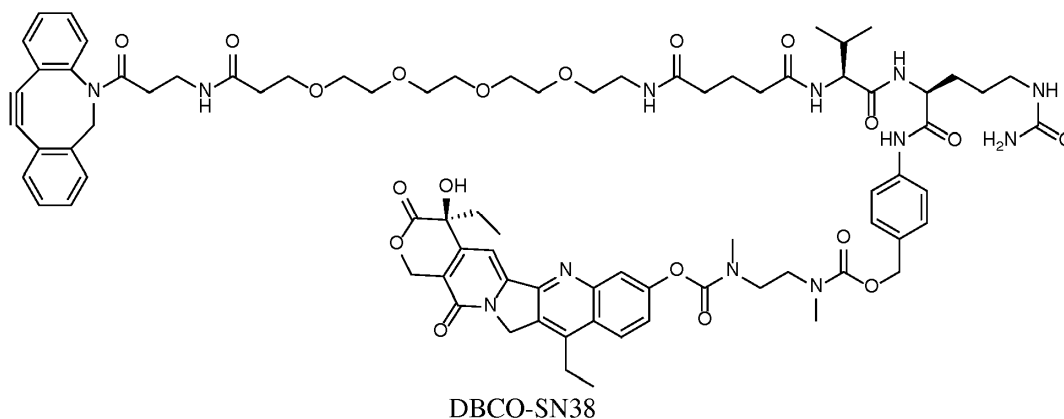
La combinación 2 fue DBCO-PBD(dímero) (más abajo, reacciona con azida) en combinación con TCO-MMAF (arriba, reacciona con tetrazina):



DBCO-PBD (dímero)

25

La combinación 3 fue DBCO-SN38 (más abajo, reacciona con azida) y TCO-MMAF (arriba, reacciona con tetrazina):



Las tres combinaciones descritas anteriormente se combinaron en cinco esquemas diferentes y después se analizaron por espectrometría de masas. Los datos sugieren que, para el Esquema 1, el producto de reacción era IgG con DBCO-gemcitabina conjugado en la posición S7 de las cadenas ligeras y TCO-MMAF conjugado en la posición F404 de las cadenas pesadas. Para el Esquema 2, los datos sugieren que el producto de reacción era IgG con DBCO-PBD(dímero) conjugado en la posición S7 de las cadenas ligeras y TCO-MMAF conjugado en la posición F404 de las cadenas pesadas. Para el Esquema 3, los datos sugieren que el producto de reacción era IgG con DBCO-SN38 conjugado en la posición S7 de las cadenas ligeras y TCO-MMAF conjugado en la posición F404 de las cadenas pesadas. Para el Esquema 4, los datos sugieren que el producto de reacción era IgG con TCO-MMAF conjugado en la posición S7 de las cadenas ligeras y DBCO-PBD(dímero) conjugado en la posición F404 de las cadenas pesadas. Para el Esquema 5, los datos sugieren que el producto de reacción era IgG con TCO-MMAF conjugado en la posición S7 de las cadenas ligeras y DBCO-Gemcitabina conjugado en la posición F404 de las cadenas pesadas. La relación de fármaco respecto a anticuerpo (DAR) para cada producto de reacción se proporciona más abajo, en la Tabla 9.

Tabla 9:

| Relaciones de fármaco respecto a anticuerpo para las combinaciones 1-5 | | | | | |
|--|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------|
| Esquema | Fármaco 1 en HC | DAR de Fármaco 1 | Fármaco 2 en LC | DAR de Fármaco 2 | DAR total |
| 1 | MMAF | 1.9 | Gemcitabina | 1.6 | 3.6 |
| 2 | MMAF | 1.8 | PBD(dímero) | 1.5 | 3.4 |
| 3 | MMAF | 1.8 | SN-38 | 1.4 | 3.2 |
| 4 | PBD(dímero) | 1.9 | MMAF | 1.7 | 3.7 |
| 5 | Gemcitabina | 2.0 | MMAF | 1.6 | 3.5 |

Por lo tanto, este ejemplo demuestra que DBCO y enlazador/fármaco que contiene TCO pueden conjugarse simultáneamente con el trastuzumab HC F404 pAMF/LC S7 tetrazina, preparado como se describió en el Ejemplo 17.

Ejemplo 19: Incorporación sitio-específica simultánea de dos aminoácidos no naturales diferentes, que permite químicas de conjugación mutuamente ortogonales

Este ejemplo describe la incorporación sitio-específica de residuos de aminoácidos no naturales diferentes en anticuerpos en una sola mezcla de reacción, y la conjugación mutuamente ortogonal posterior de fármacos con estos aminoácidos no naturales.

Las reacciones de síntesis de proteínas libres de células se llevaron a cabo esencialmente como se describió en el Ejemplo 17, con las siguientes variaciones para permitir la incorporación sitio-específica de nnAA usando dos codones de parada diferentes. Las aminoacil ARNt sintetasas PyrTetRS (sec. con núm. de ident.: 8) y PiiRS (sec. con núm. de ident.: 9) se expresaron y purificaron por separado y se añadieron como componentes exógenos a las reacciones de expresión libre de células. Las reacciones contenían, además, ARNt supresores ortogonales reconocidos exclusivamente por PyrTetRS o PiiRS. En este ejemplo, PyrTetRS carga un ARNt supresor de codón ópalo (TGA) (sec. con núm. de ident.: 10) con compuesto A6 y PiiRS carga un ARNt supresor de codón ámbar (TAG) (sec. con núm. de ident.: 11) con compuesto 19 y el codón ocre (TAA) se usa para terminar la traducción de proteínas. Las plantillas de ADN plasmídico que codifican las proteínas productos tenían codones TAG o TGA en la posición de codón correspondiente al sitio deseado de incorporación de nnAA. Esto puede incluir la incorporación de dos nnAA diferentes en un único polipéptido (por ejemplo, la cadena pesada o la cadena ligera) o en polipéptidos diferentes (por ejemplo, un compuesto en la cadena pesada y un compuesto en la cadena ligera).

- Los compuestos de aminoácido no natural se incorporaron en las cadenas pesadas y ligeras de tres anticuerpos: trastuzumab (HC: Sec. con núm. de ident.: 1; LC: Sec. con núm. de ident.: 2); brentuximab (HC: Sec. con núm. de ident.: 3; LC: Sec. con núm. de ident.: 4); y anti-CD74 (HC: Sec. con núm. de ident.: 12; LC: Sec. con núm. de ident.: 13).
- 5 Después estos anticuerpos se conjugaron con DBCO-Gemcitabina, o DBCO-DM1 y con TCO-MMAF en una reacción en un único recipiente esencialmente en las mismas condiciones de reacción como se describió en el Ejemplo 17, anteriormente. Las relaciones de fármaco respecto a anticuerpo (DAR) se determinaron mediante los métodos descritos en el Ejemplo 12.
- 10 La Tabla 10 muestra las DAR resultantes para varias combinaciones de anticuerpo, sitios de incorporación de nnAA, y fármacos conjugados con los nnAA incorporados.

Tabla 10:

| Relaciones de fármaco respecto a anticuerpo para anticuerpos producidos en una sola mezcla de reacción | | | | | |
|--|-----------------|-----------------|------------------|-----------|-----|
| Anticuerpo | Sitio de nnAA 1 | Sitio de nnAA 2 | Fármaco 1 | Fármaco 2 | DAR |
| Trastuzumab | HC S136 AEK | LC S7 PyrTet | DBCO-Gemcitabina | TCO-MMAF | 2.6 |
| Trastuzumab | HC K147 AEK | LC S7 PyrTet | DBCO-DM1 | TCO-MMAF | 3.3 |
| Trastuzumab | HC S25 PyrTet | LC K45 AEK | TCO-MMAF | DBCO-DM1 | 3.6 |
| Trastuzumab | HC S25 PyrTet | HC K147 AEK | TCO-MMAF | DBCO-DM1 | 3.0 |
| Trastuzumab | LC S7 PyrTet | LC K39 AEK | TCO-MMAF | DBCO-DM1F | 1.8 |
| Trastuzumab | LC S7 PyrTet | LC S77 AEK | TCO-MMAF | DBCO-DM1 | 2.6 |
| Trastuzumab | LC S7 PyrTet | LC R142 AEK | TCO-MMAF | DBCO-DM1 | 2.6 |
| Brentuximab | HC K147 AEK | LC S7 PyrTet | DBCO-DM1 | TCO-MMAF | 2.7 |
| Brentuximab | LC S27 PyrTet | LC R147 AEK | TCO-MMAF | DBCO-DM1 | 1.6 |
| Brentuximab | HC S25 PyrTet | HC K147 AEK | TCO-MMAF | DBCO-DM1 | 2.1 |
| Anti-CD74 | HC K147 AEK | LC S7 PyrTet | DBCO-DM1 | TCO-MMAF | 2.0 |
| Anti-CD74 | LC S7 PyrTet | LC R143 AEK | TCO-MMAF | DBCO-DM1 | 2.8 |
| Anti-CD74 | HC S25 PyrTet | HC K147 AEK | TCO-MMAF | DBCO-DM1 | 2.0 |

PyrTet = compuesto de la Fórmula (A6); *AEK* = compuesto de la Fórmula (19); *DAR* = relación total de fármaco respecto a anticuerpo (escala: 0 a 4).

- 15 En todos los casos, las especies se identificaron en los espectros de masa deconvolucionados que correspondían a una IgG conjugada con ambos fármacos simultáneamente en relaciones de 1:1, 2:1, 1:2 y/o 2:2, lo que indica la incorporación exitosa de ambos nnAA y conjugación simultánea a al menos una molécula de cada fármaco.

Lista de Secuencias

<210> sec. con núm. de ident. 1
 <211> LONGITUD: 449
 <212> TIPO: PRT
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERÍSTICA:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: la secuencia es sintetizada
 <400> SECUENCIA: 1

5

10

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |
| Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Asn | Ile | Lys |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 |
| Asp | Thr | Tyr | Ile | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu |
| | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 |
| Glu | Trp | Val | Ala | Arg | Ile | Tyr | Pro | Thr | Asn | Gly | Tyr | Thr | Arg | Tyr |
| | | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 |
| Ala | Asp | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Ala | Asp | Thr | Ser |
| | | | | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 |
| Lys | Asn | Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp |
| | | | | 80 | | | | | 85 | | | | | 90 |
| Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ser | Arg | Trp | Gly | Gly | Asp | Gly | Phe | Tyr |
| | | | | 95 | | | | | 100 | | | | | 105 |
| Ala | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser |
| | | | | 110 | | | | | 115 | | | | | 120 |
| Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser |
| | | | | 125 | | | | | 130 | | | | | 135 |
| Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys |
| | | | | 140 | | | | | 145 | | | | | 150 |
| Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala |
| | | | | 155 | | | | | 160 | | | | | 165 |
| Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser |
| | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | 180 |
| Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser |
| | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | 195 |
| Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser |
| | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | 210 |
| Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys |
| | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | 225 |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly |
| | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 |
| Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 |
| His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val |
| | | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 |
| Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn |
| | | | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 |
| Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp |
| | | | | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 |
| Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala |
| | | | | 320 | | | | | 325 | | | | | 330 |
| Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln |
| | | | | 335 | | | | | 340 | | | | | 345 |
| Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu |
| | | | | 350 | | | | | 355 | | | | | 360 |
| Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe |
| | | | | 365 | | | | | 370 | | | | | 375 |
| Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro |
| | | | | 380 | | | | | 385 | | | | | 390 |

ES 2 658 039 T3

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 395 400 405
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 410 415 420
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 425 430 435
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445

<210> sec. con núm. de ident. 2

5 <211> LONGITUD: 214

<212> TIPO: PRT

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: La secuencia es sintetizada.

10 <400> SECUENCIA: 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210
 Arg Gly Glu Cys

sec. con núm. de ident.: 3

15

> Secuencia de cadena pesada de brentuximab: HC-6His

MQIQQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVKQKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDI
 SSSTAFMQLSSLTSEDVAVYFCANYGNYWFAYWGQGTQVTVSAASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKITPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNYTQKLSLSLSPGKGG
 SHHHHHH

20 sec. con núm. de ident.: 4

> Secuencia de cadena ligera de brentuximab: LC

MDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGSYMNWYQQKPGQPPKVLIIYAASNLESGIPARFSGSGSGTD
 FTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPWFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAK
 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

25

sec. con núm. de ident.: 5

> Secuencia de tirosil-ARNt sintetasa (TyrRS) silvestre de *Methanococcus jannaschii*; EC 6.1.1.1; secuencia de referencia de NCBI núm. NP 247363

5
 1 MDEFEMIKRN TSEIISEEEL REVLKKDEKS AYIGFEPSPGK IHLGHYLQIK KMIDLQAGF
 61 DIIILLADLH AYLNQKGELD EIRKIGDYNK KVFEAMGLKA KYVYGSEFQL DKDYTLNVYR
 121 LALKTTLKRA RRSMEIARE DENPKVAEVI YPIMQVNDIH YLGVDVAVGG MEQRKIHMLA
 181 RELLPKKVVC IHNPVLTGLD GEGKMSSSKG NFIAVDDSP EIRAKIKKAY CPAGVVEGPN
 241 IMEIAKYFLE YPLTIKRPEK FGGDLTVNSY EELESFLKKN ELHPMDLKNA VAEELIKILE
 301 PIRKRL

sec. con núm. de ident. 6

10 > 2A2

1 MDEFEMIKRN TSEIISEEEL REVLKKDEKS ALIGFEPSPGK IHLGHYLQIK KMIDLQAGF
 61 DIIIVLADLA AYLNQKGELD EIRKIGDYNK KVFEAMGLKA KYVYGSEWSL DKDYTLNVYR
 121 LALKTTLKRA RRSMEIARE DENPKVAEVI YPIMQVNVAH YVGVDVAVGG MEQRKIHMLA
 181 RELLPKKVVC IHNPVLTGLD GEGKMSSSKG NFIAVDDSP EIRAKIKKAY CPAGVVEGPN
 241 IMEIAKYFLE YPLTIKRPEK FGGDLTVNSY EELESFLKKN ELHPMDLKNA VAEELIKILE
 301 PIRKRL

sec. con núm. de ident. 7

15

> 2A9

1 MDEFEMIKRN TSEIISEEEL REVLKKDEKS AGIGFEPSPGK IHLGHYLQIK KMIDLQAGF
 61 DIIIVLADLA AYLNQKGELD EIRKIGDYNK KVFEAMGLKA KYVYGSEFSL DKDYTLNVYR
 121 LALKTTLKRA RRSMEIARE DENPKVAEVI YPIMQVNGIH YSGVDVAVGG MEQRKIHMLA
 181 RELLPKKVVC IHNPVLTGLD GEGKMSSSKG NFIAVDDSP EIRAKIKKAY CPAGVVEGPN
 241 IMEIAKYFLE YPLTIKRPEK FGGDLTVNSY EELESFLKKN ELHPMDLKNA VAEELIKILE
 301 PIRKRL

20 sec. con núm. de ident. 8

> PyrTetRS

MDEFEMIKRNTSEIISEEELREVLKKDEKSAGIGFEPSPGKIHLGHYLQIKKMIDLQAGFDIIIVLADLAAYLNQ
 KGELDEIRKIGDYNKKVFEAMGLKAKYVYGSEFSLDKDYTLNVYRLALKTTLKRRRSMEIAREDENPKVAEVI
 YPIMQVNGIHYSGVDVAVGGMEQRKIHMLARELLPKKVVCIHNPVLTGLDGEKMSKSNFIAVDDSP EIRAK
 IKKAYCPAGVVEGPNIMEIAKYFLEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELESFLKKNELHPMRLKNAVAEELIKILE
 PIRKRLHHHHHH

25

sec. con núm. de ident. 9

> PilRS de *Methanosarcina barkeri*

MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRARAFRHHKYRKTCKRCRVS
 DEDINNFLTRSTESKNSVKVRVVSAPKVKKAMPKSVSRAPKPLENSVSAKASTNTRSVPSPAKSTPNSSVPASA
 PAPSLTRSQDRVEALLSPEDKISLNMAKPFRELEPELVTRRKNDFQRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRGFL
 EIKSPILIPAEYVERMGINNDTELSKQIFRVDKNLCLRPMLAPTLNYLRKLDRI LPGA IKIFEVGPCYRKESDG
 KEHLEEFMVFQMGSGCTRENLEALIKEFLDYLEIDFEIVGDSVMVYGDITLDIMHGDLLELSSAVVGPVSLDRE
 WGIDKWPWIGAGFLERLLKVMHGFKNIKRSRSESYNGISTNL

30

sec. con núm. de ident. 10

> supresor ópalo de *M. jannaschii*

35

CCCGCCTTAGITCAGAGGGCAGAACGGCGACTTCAAATCCGCATGGCACGGGTTCAAATCCCGTAGCGGGACC
 A

sec. con núm. de ident. 11

40 > supresor ámbar de *Methanosarcina mazei* (PilRS)

GGAAACCTGATCATGTAGATCGAACGGACTCTAAATCCGTTCCAGCCGGGTTAGATTCCCGGGGTTTCCGCCA

sec. con núm. de ident. 12

> ANTI-CD74 HC

MQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPDKGLEWVAVIWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGTLVRGAMYGTDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAAALG
CLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGSHHHHHH

5

sec. con núm. de ident. 13

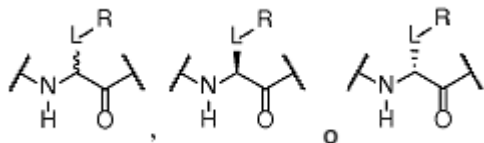
> ANTI-CD74 LC

MDIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSIQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

Reivindicaciones

- 5 1. Un anticuerpo que comprende dos o más residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos, en donde al menos uno de dichos residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos comprende una fracción de azida y al menos uno de dichos residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos comprende una fracción de tetrazina.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende:
 - (a) dos o más residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos en una sola cadena ligera; o
 - (b) dos o más residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos en una sola cadena pesada; en donde dichos residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos no son uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína, o variantes postraduccionales modificadas de estos.
- 15 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende:
 - (a) al menos un aminoácido no natural sitio-específico en una cadena ligera y al menos un aminoácido no natural sitio-específico en una cadena pesada;
 - (b) al menos un aminoácido no natural sitio-específico en una cadena ligera y al menos un aminoácido no natural sitio-específico en cada una de las dos cadenas pesadas;
 - 20 (c) al menos un aminoácido no natural sitio-específico en cada una de las dos cadenas ligeras y al menos un aminoácido no natural sitio-específico en una cadena pesada; o
 - (d) al menos un aminoácido no natural sitio-específico en cada una de las dos cadenas ligeras y al menos un aminoácido no natural sitio-específico en cada una de las dos cadenas pesadas; en donde dichos residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos no son uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína, o variantes postraduccionales modificadas de estos.
- 25 4. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende:
 - (a) tres o más, cuatro o más, cinco o más o seis o más residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos; o
 - 30 (b) dos a seis residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos; en donde dichos residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos no son uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína, o variantes postraduccionales modificadas de estos.
- 35 5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde los residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos están en posiciones de secuencia que se seleccionan del grupo que consiste en los residuos de cadena pesada o de cadena ligera EU H404, EU H121, EU H180, Kabat/Chothia L22, Kabat/Chothia L7, EU L152, EU H136, Kabat/Chothia H25, Kabat/Chothia H40, EU H119, EU H190, EU H222, Kabat/Chothia H19, Kabat/Chothia H52, Kabat/Chothia H70, Kabat/Chothia H110, o EU H221.
- 40 6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dichos dos o más residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos están en posiciones de secuencia que corresponden a los residuos seleccionados del grupo que consiste en los residuos 407, 124, 183, 139, 25, 40, 122, 193, 225, 19, 52, 71, 117 o 224 de la cadena pesada representativa de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1; opcionalmente además en donde dichos dos o más residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos están en posiciones de secuencia que corresponden a los residuos seleccionados del grupo que consiste en los residuos 22, 7 o 152 de la cadena ligera representativa de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 2.
- 45 7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende:
 - (a) una cadena pesada de un tipo seleccionado del grupo que consiste en α , δ , ϵ , γ , y μ ; o
 - 50 (b) una cadena ligera de un tipo seleccionado de λ y κ ; opcionalmente además en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.
8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que es una clase o subclase seleccionada del grupo que consiste en IgA, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgM.
- 55 9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, y 4-5, en donde dicho anticuerpo es un Fv, un Fab, un F(ab')₂, un Fv de cadena sencilla (scFv), o anticuerpo de longitud completa.
- 60 10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo comprende un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción seleccionada del grupo que consiste en amino, carboxi, acetilo, hidrazino, hidrazido, semicarbazido, sulfanilo, y alquinilo, en donde dicho residuo de aminoácido no natural sitio-específico no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína, o variantes modificadas postraduccionales de estos; opcionalmente además en donde cada residuo de aminoácido no natural sitio-específico es de acuerdo con la fórmula



en donde cada L es independientemente un enlazador divalente; y cada R es independientemente un grupo funcional.

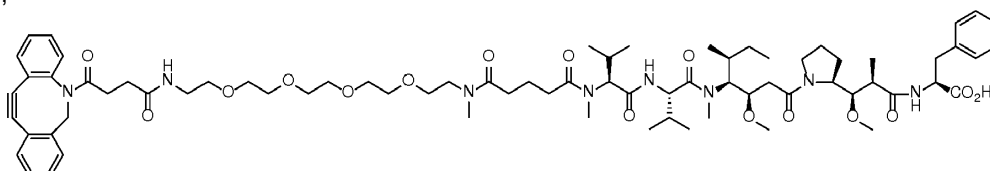
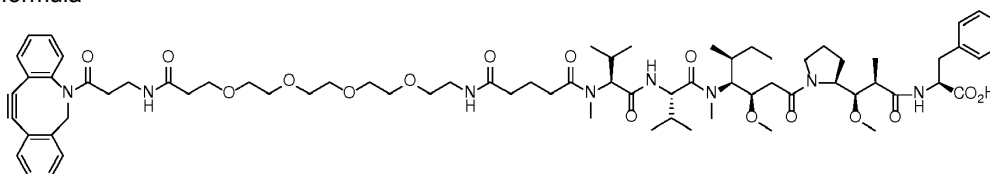
5

11. El anticuerpo de la reivindicación 10 en donde:
- (a) R es un grupo reactivo, una fracción terapéutica o una fracción marcadora;
 - (b) en donde cada R es un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en amino, carboxi, acetilo, hidrazino, hidrazido, semicarbazido, sulfanilo, azido, alquiniilo, y tetrazina; o
 - (c) cada L es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en un enlace, alquileno, alquileno sustituido, heteroalquileno, heteroalquileno sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno y heteroarileno sustituido.
12. Un conjugado de anticuerpo que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes unido a una o más fracciones terapéuticas o fracciones marcadoras.
13. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 12, en donde:
- (a) la una o más fracciones terapéuticas es uno o más fármacos o polímeros;
 - (b) la una o más fracciones terapéuticas o fracciones marcadoras es uno o más dominios de unión de cadena simple (scFv);
 - (c) al menos una de dichas fracciones terapéuticas o fracciones marcadoras se une a dicho anticuerpo a través de un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción azida; o
 - (d) al menos una de dichas fracciones terapéuticas o fracciones marcadoras se une a dicho anticuerpo a través de un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción de tetrazina.
14. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 12 en donde al menos una de dichas fracciones terapéuticas o fracciones marcadoras se une a dicho anticuerpo a través de un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción azida, y al menos una de dichas fracciones terapéuticas o fracciones marcadoras se une a dicho anticuerpo a través de un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción de tetrazina.
15. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 14, en donde:
- (a) una primera fracción terapéutica se une a dicho anticuerpo a través de un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción azida, y una segunda fracción terapéutica se une a dicho anticuerpo a través de un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción de tetrazina;
 - (b) una primera fracción marcadora se une a dicho anticuerpo a través de un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción azida, y una segunda fracción marcadora se une a dicho anticuerpo a través de un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción de tetrazina;
 - (c) una fracción terapéutica se une a dicho anticuerpo a través de un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción de azida, y una fracción marcadora se une a dicho anticuerpo a través de un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción de tetrazina; o
 - (d) una fracción marcadora se une a dicho anticuerpo a través de un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción de azida, y una fracción terapéutica se une a dicho anticuerpo mediante un residuo de aminoácido no natural sitio-específico que comprende una fracción de tetrazina.
16. El conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 12-15 en donde dicho anticuerpo se une a dicha una o más fracciones terapéuticas o fracciones marcadoras a través de uno o más enlazadores; opcionalmente además en donde dicho conjugado de anticuerpo tiene una temperatura de fusión dentro de aproximadamente cinco grados Celsius del anticuerpo sin los aminoácidos no naturales sitio-específicos; opcionalmente además en donde dicho conjugado de anticuerpo tiene una temperatura de fusión que es al menos aproximadamente tres grados Celsius mayor que aquella del anticuerpo sin los aminoácidos no naturales sitio-específicos; opcionalmente además en donde dicha temperatura de fusión se selecciona del grupo que consiste en Tm1 y Tm2.
17. Una composición que comprende el anticuerpo o conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
- (a) dicha composición comprende al menos 80% en peso del anticuerpo o conjugado de anticuerpo; o

60

(b) dicho anticuerpo o conjugado de anticuerpo es al menos 95% en masa de la masa del anticuerpo total o conjugado de anticuerpo de dicha composición.

- 5 18. El conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 12-17 para usar en terapia.
19. El conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 12-17 para usar en el tratamiento de un sujeto afectado por cáncer.
- 10 20. El conjugado de anticuerpo para usar de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicho cáncer es cáncer de mama.
21. El conjugado de anticuerpo para usar de acuerdo con la reivindicación 19 en donde:
- (a) dicho conjugado de anticuerpo comprende al menos dos residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos en la posición H404 de acuerdo con el esquema de numeración de EU; o
- 15 (b) dicho conjugado de anticuerpo comprende al menos cuatro residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos, opcionalmente además en donde dichos al menos cuatro residuos de aminoácidos no naturales sitio-específicos se localizan en las posiciones que comprenden H136 y L57 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia.
- 20 22. El conjugado de anticuerpo para usar de acuerdo con la reivindicación 19 en donde dicho conjugado de anticuerpo comprende un fármaco o una fracción marcadora, opcionalmente en donde:
- (a) dicho fármaco es un fármaco útil en el tratamiento del cáncer; o
- (b) dicho fármaco es una auristatina, opcionalmente, además, en donde:
- 25 (i) dicha auristatina se selecciona del grupo que consiste en auristatina E, AEB, AEVB, AFP, MMAF, y MMAE; o
- (ii) en donde el conjugado comprende una auristatina unida a un residuo de un enlazador de acuerdo con la fórmula



30

Figura 1A

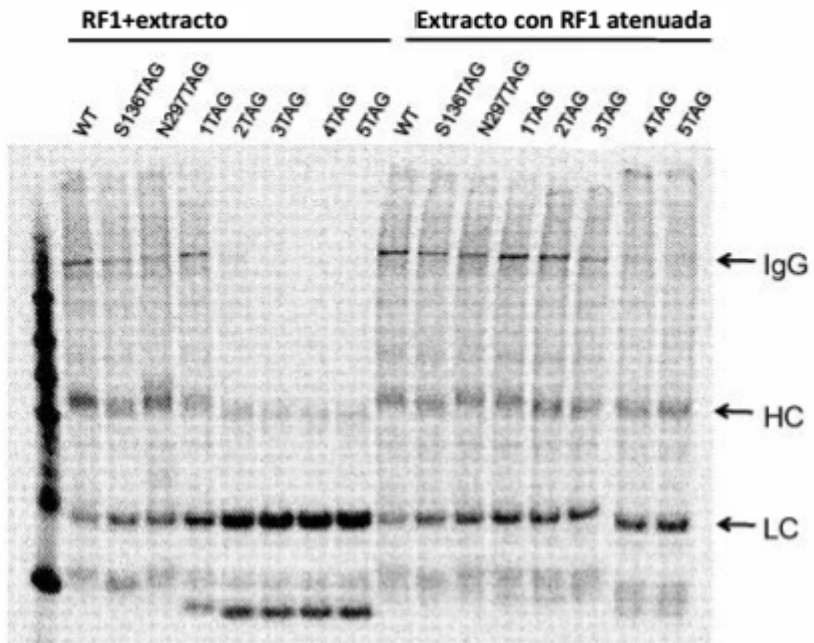
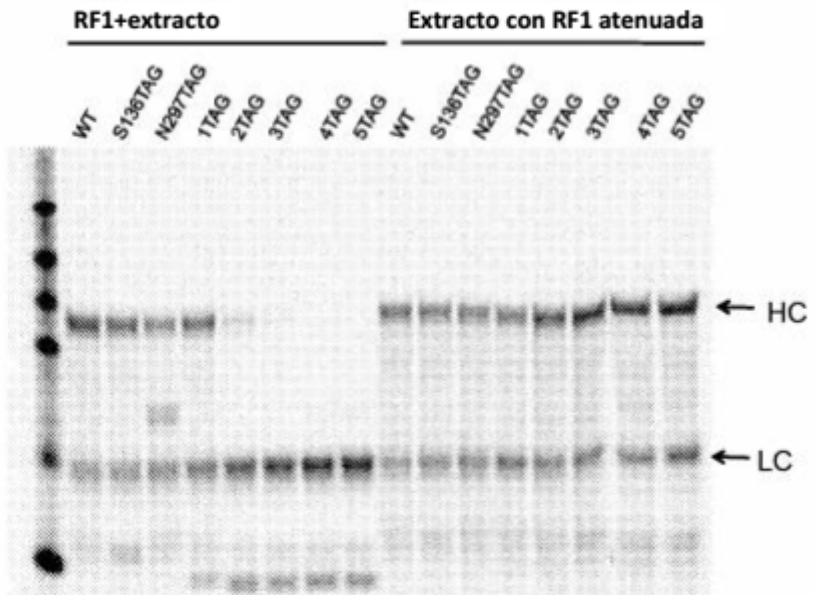


Figura 1B



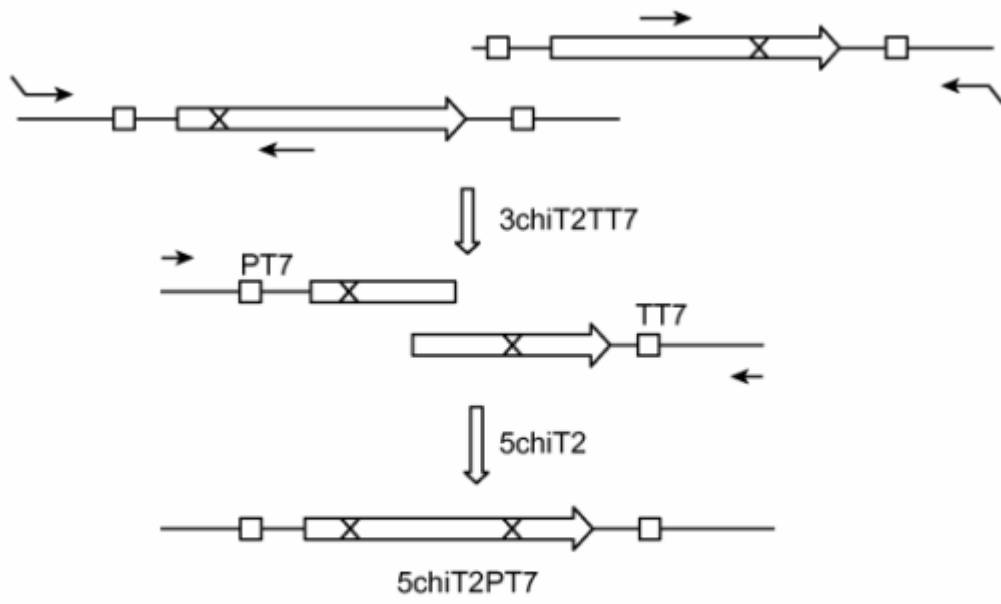


Figura 2

Figura 3A

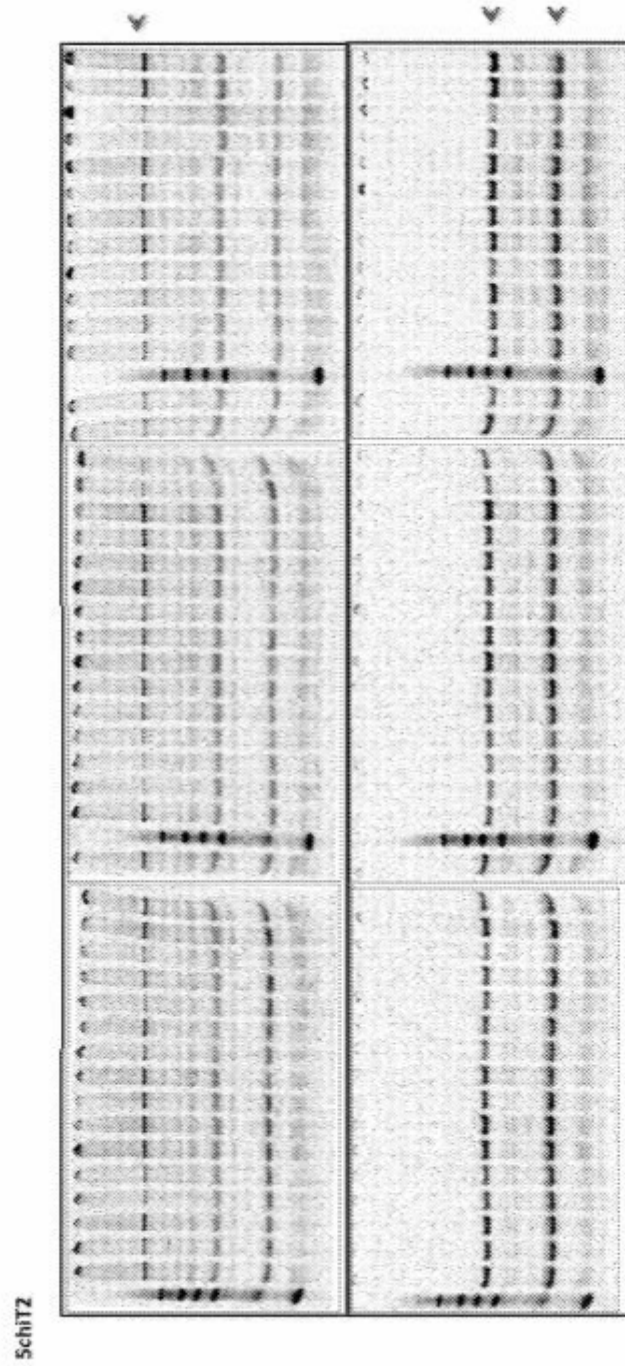
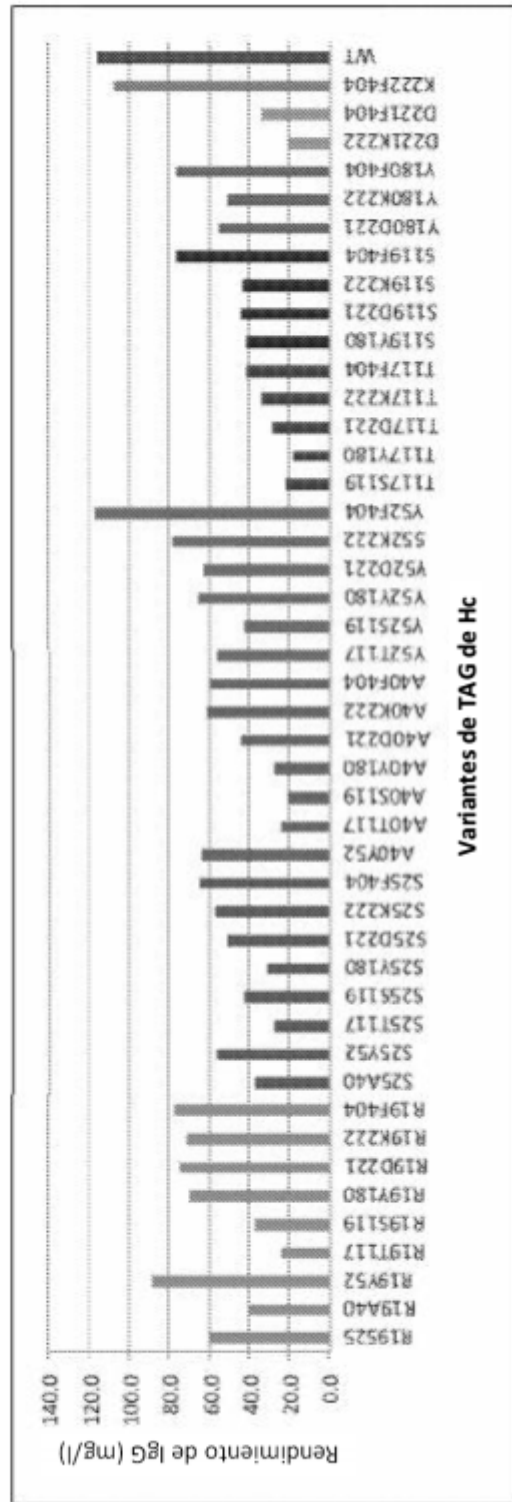


Figura 3B



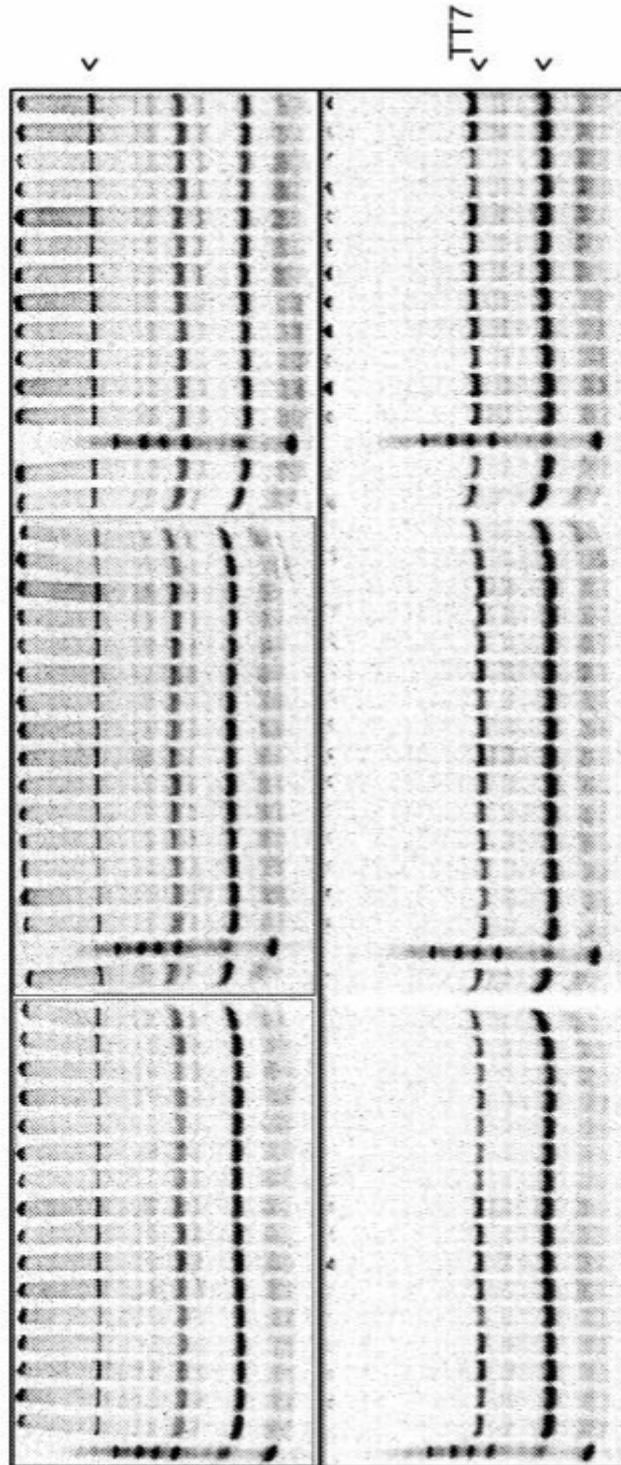


Figura 4A

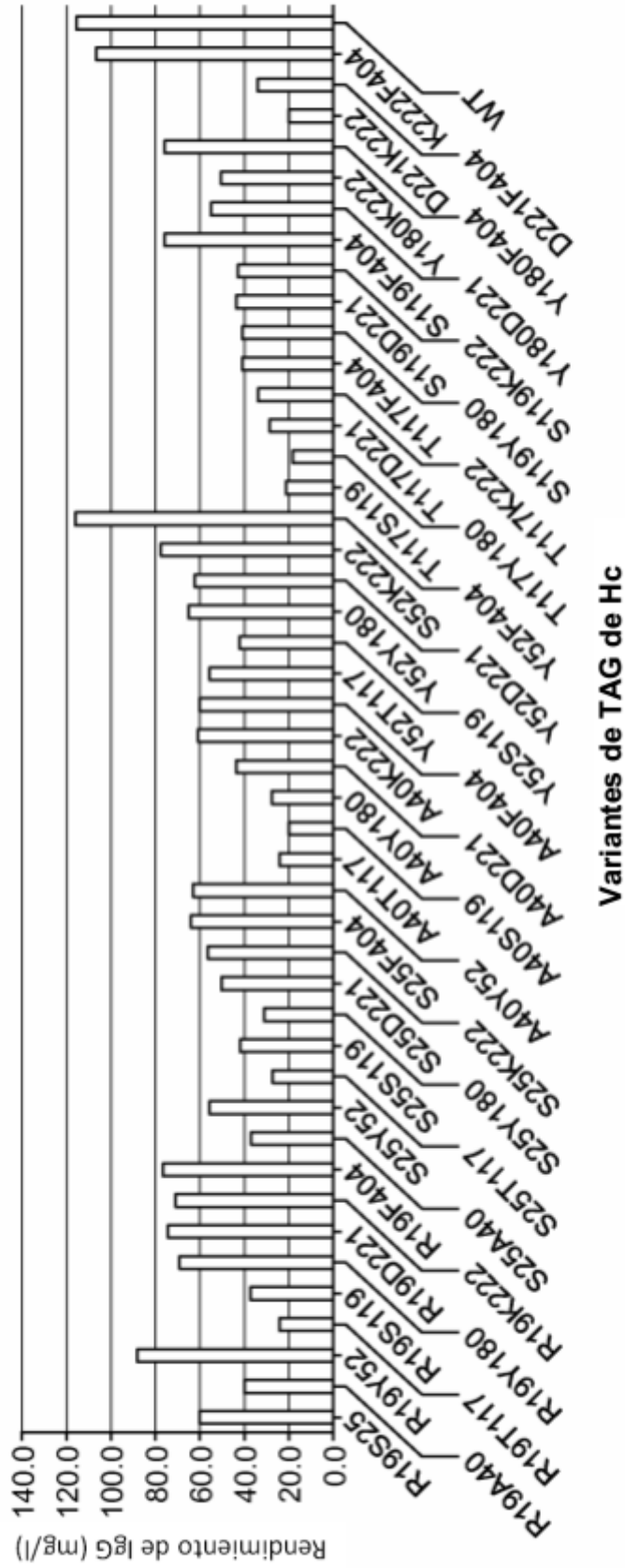
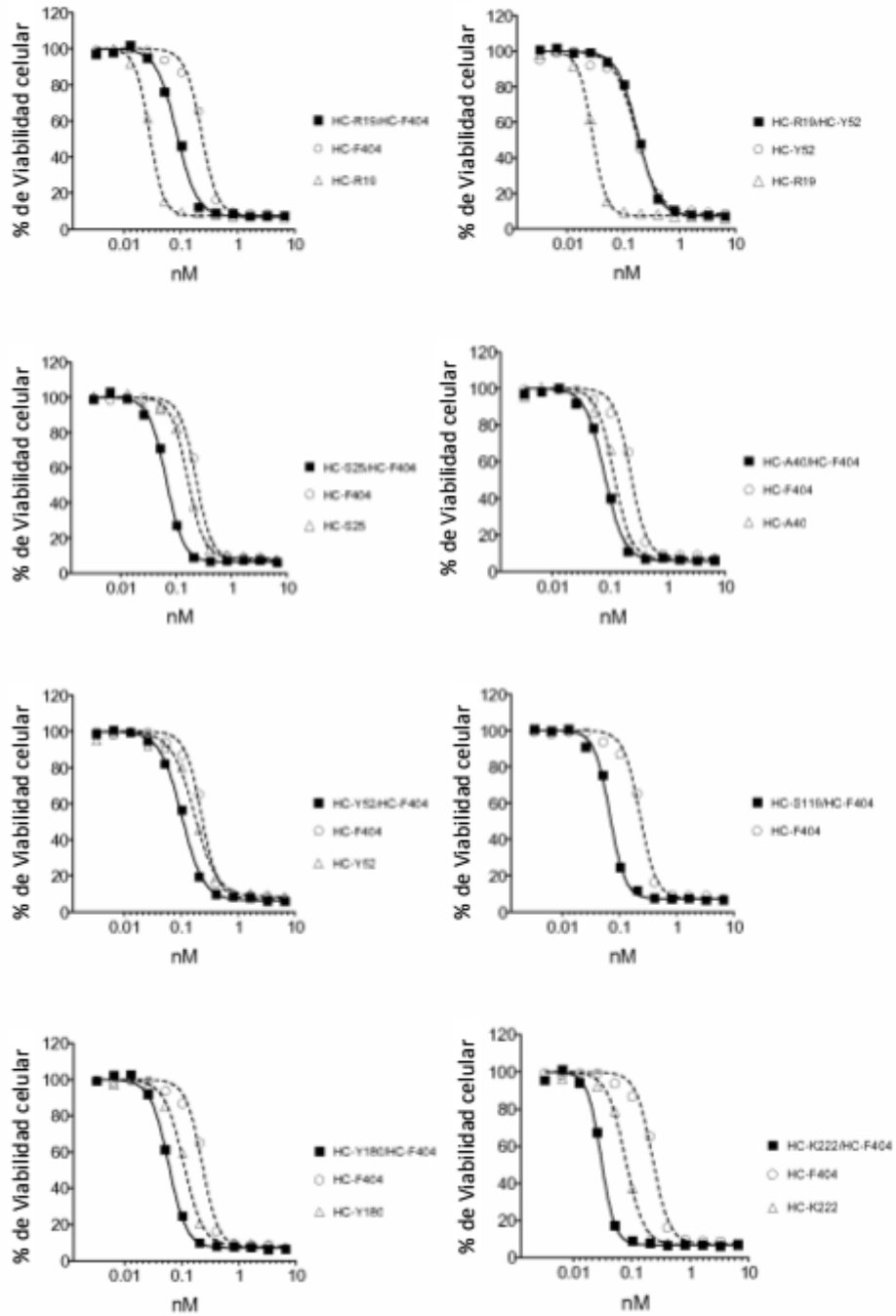


Figura 4B

Figura 5



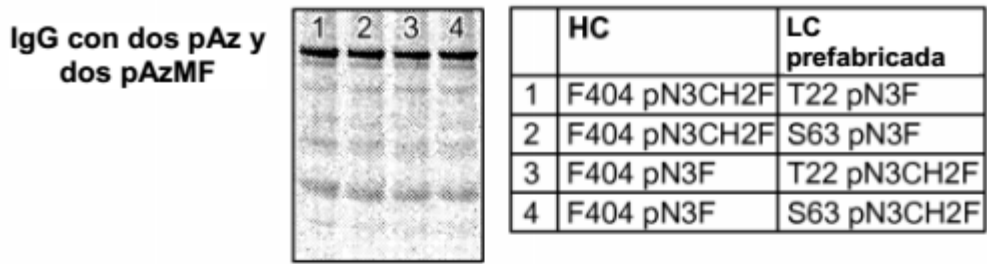


Figura 6

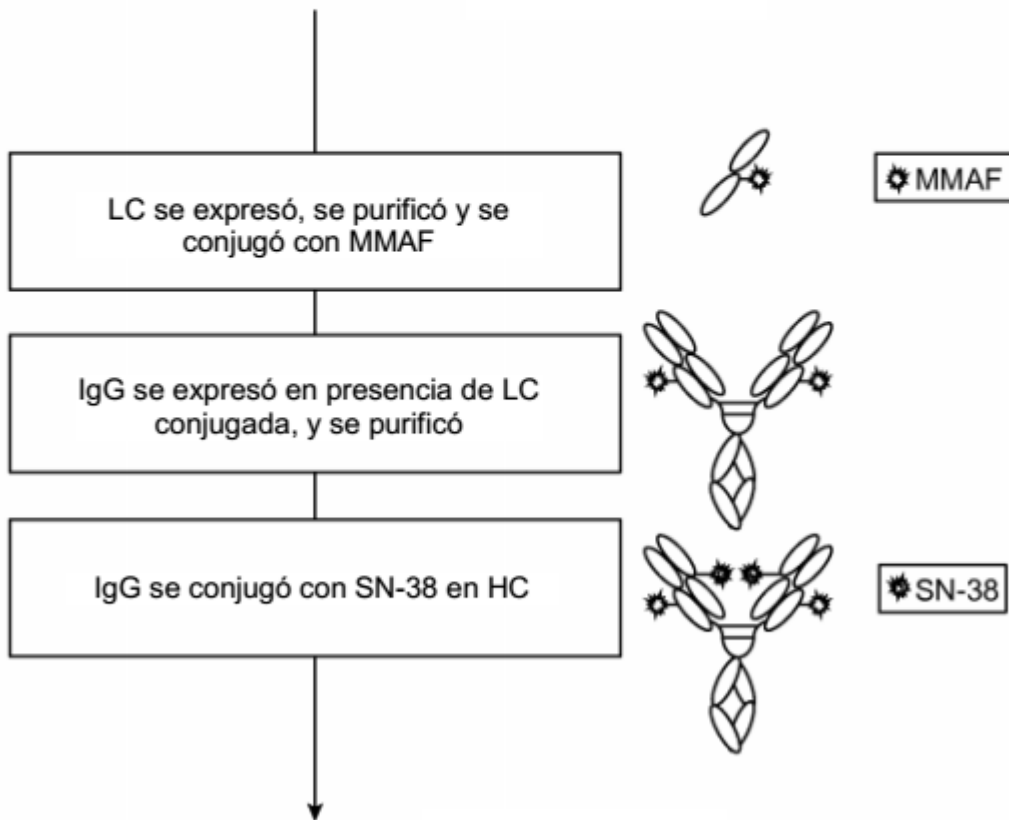


Figura 7

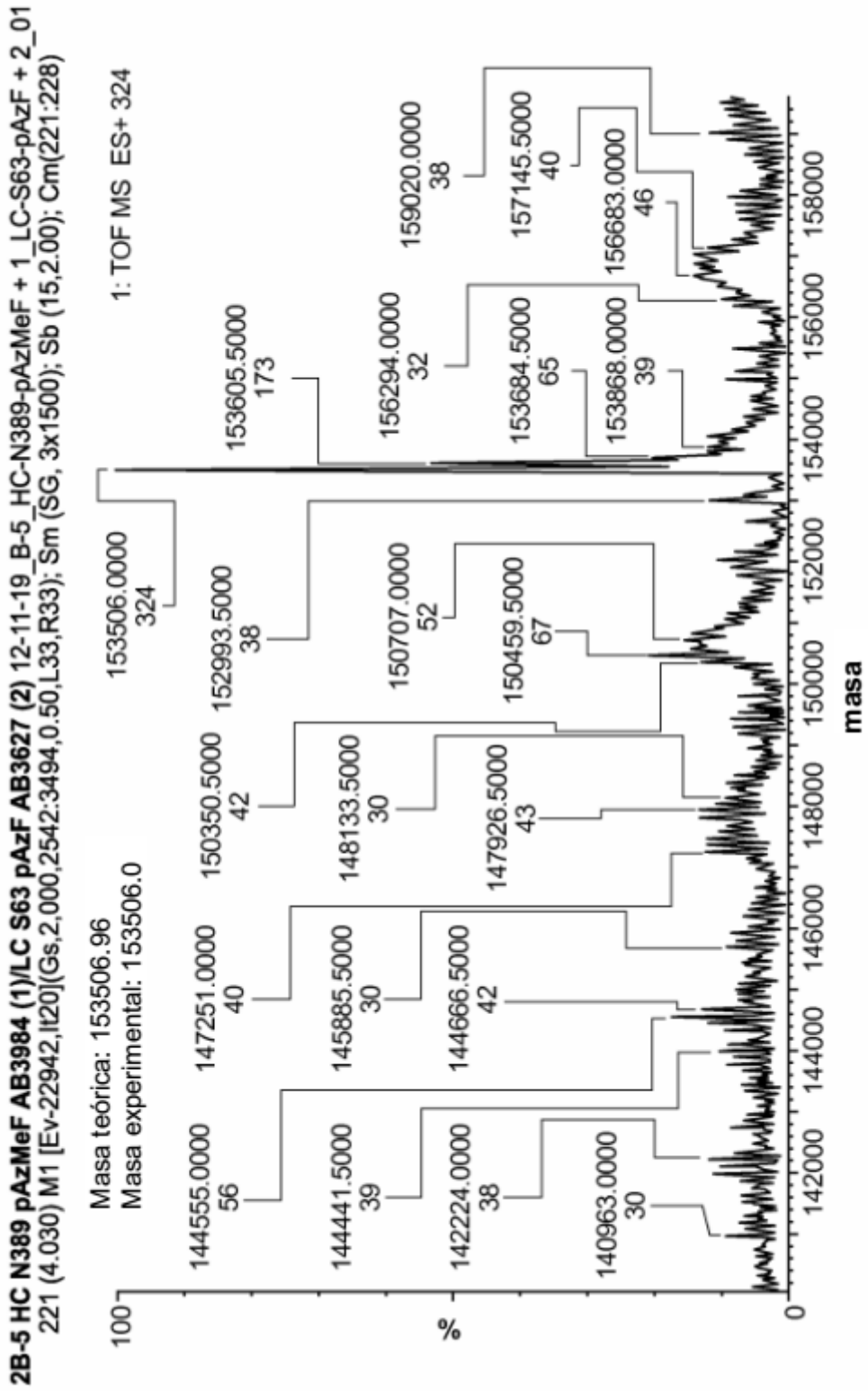


Figura 8A

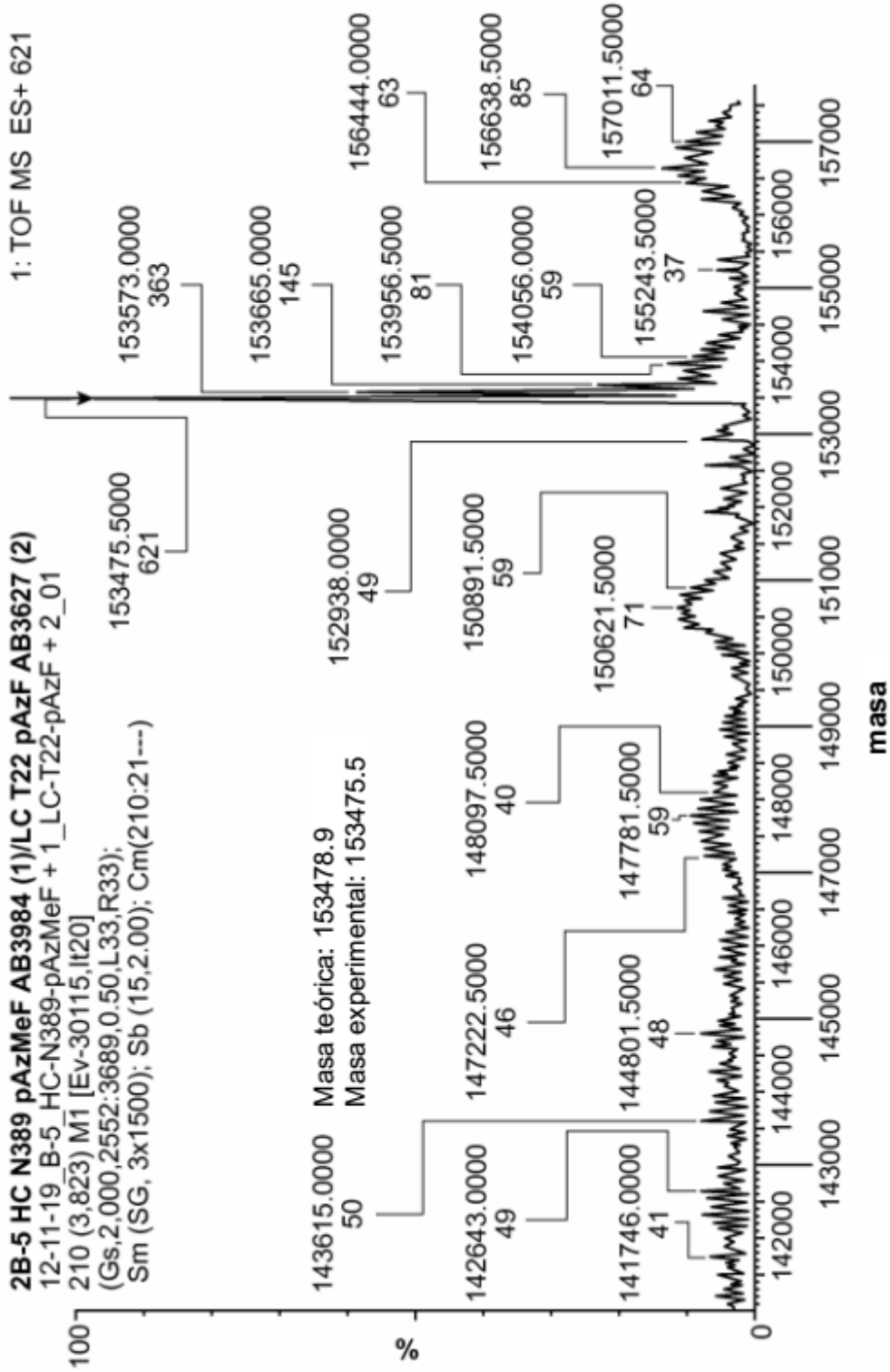


Figura 8B

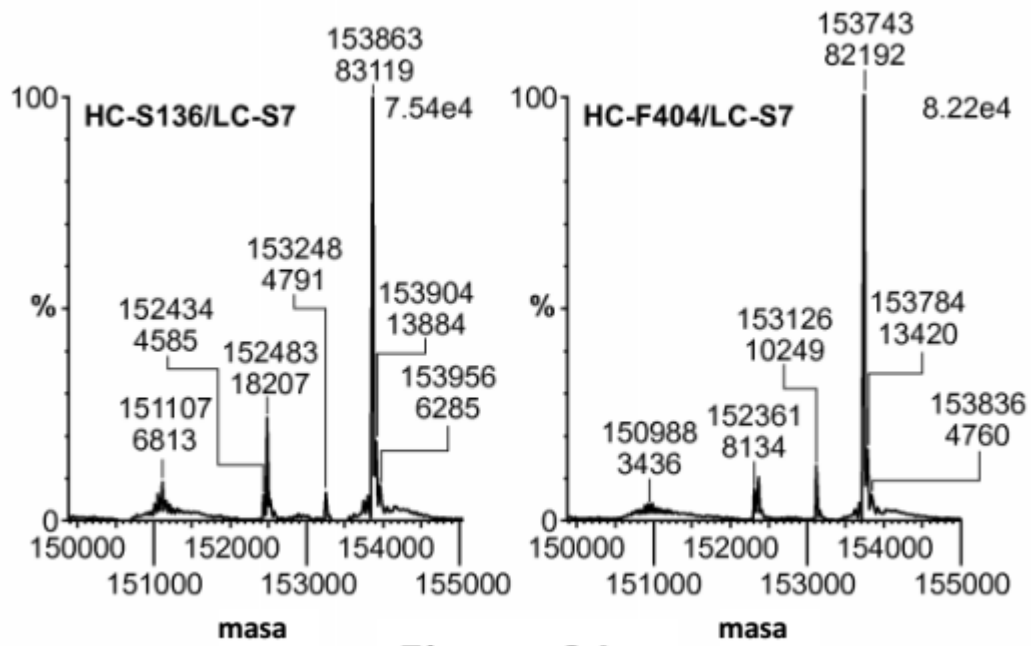


Figura 9A

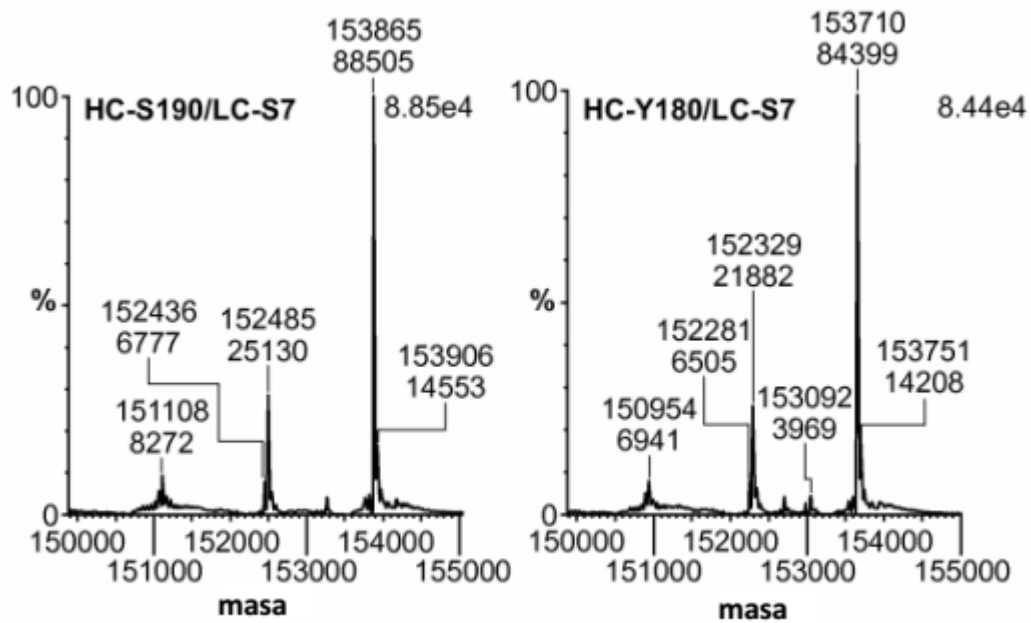


Figura 9B

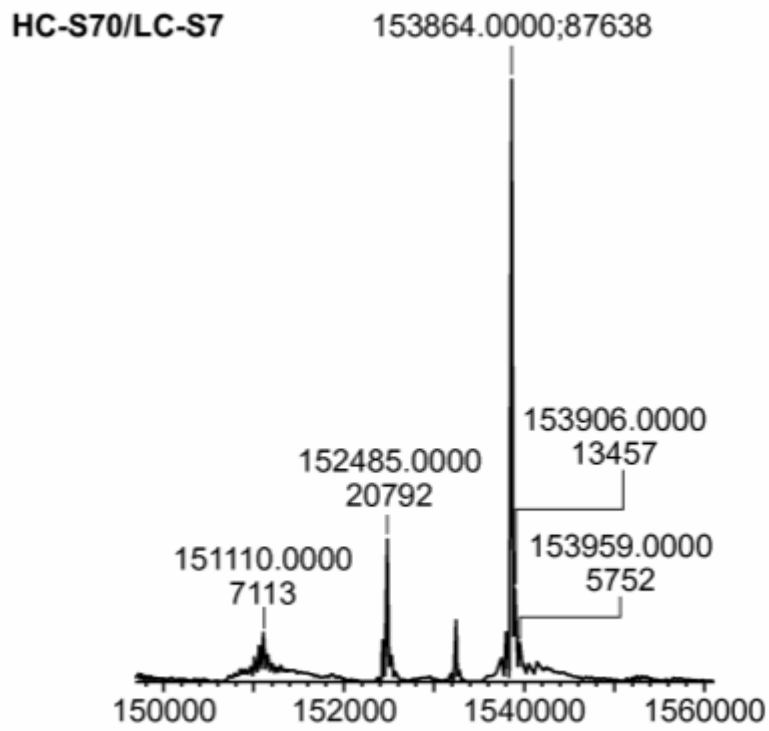


Figura 9C

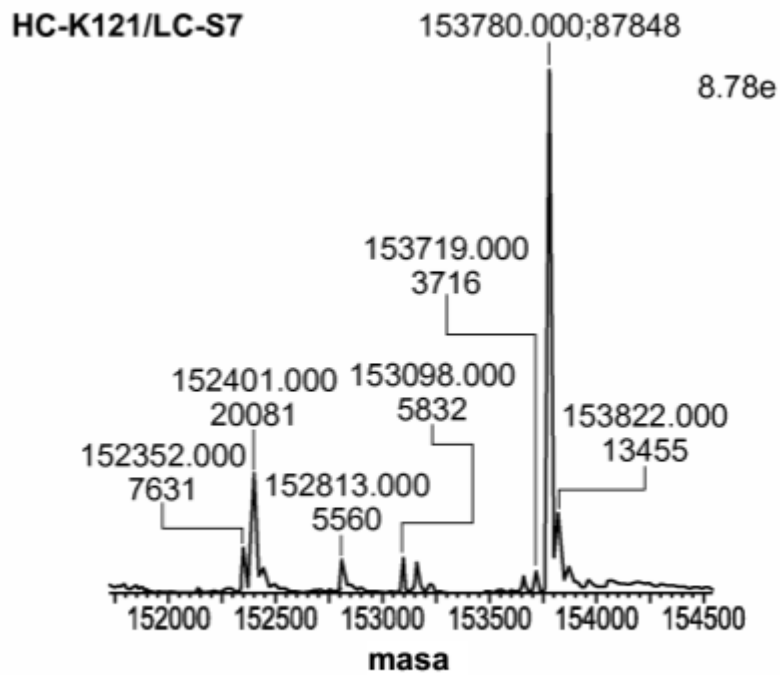


Figura 9D

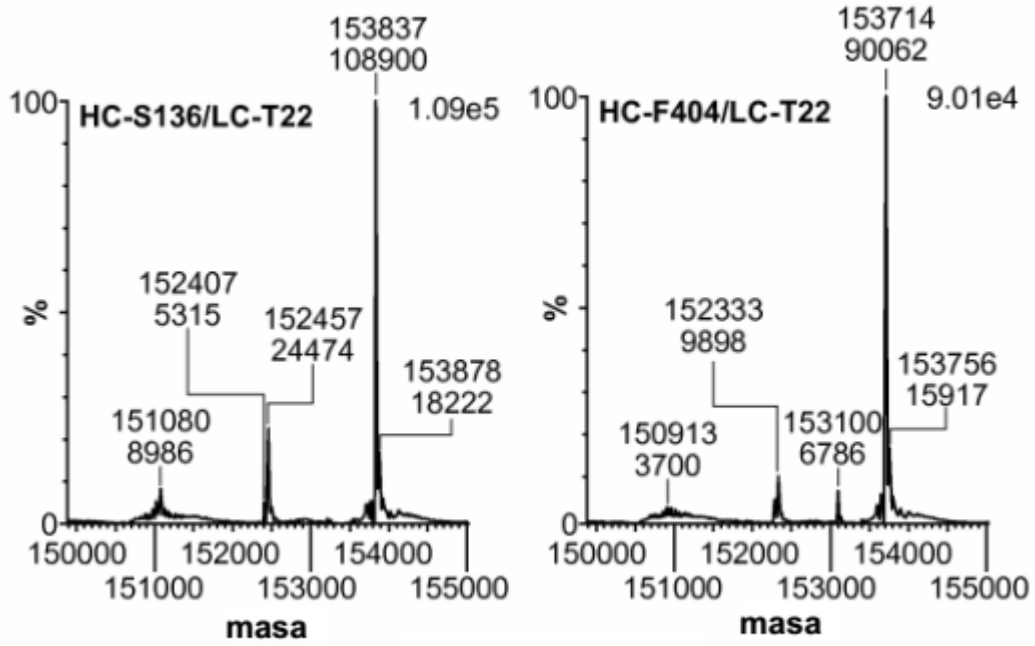


Figura 9E

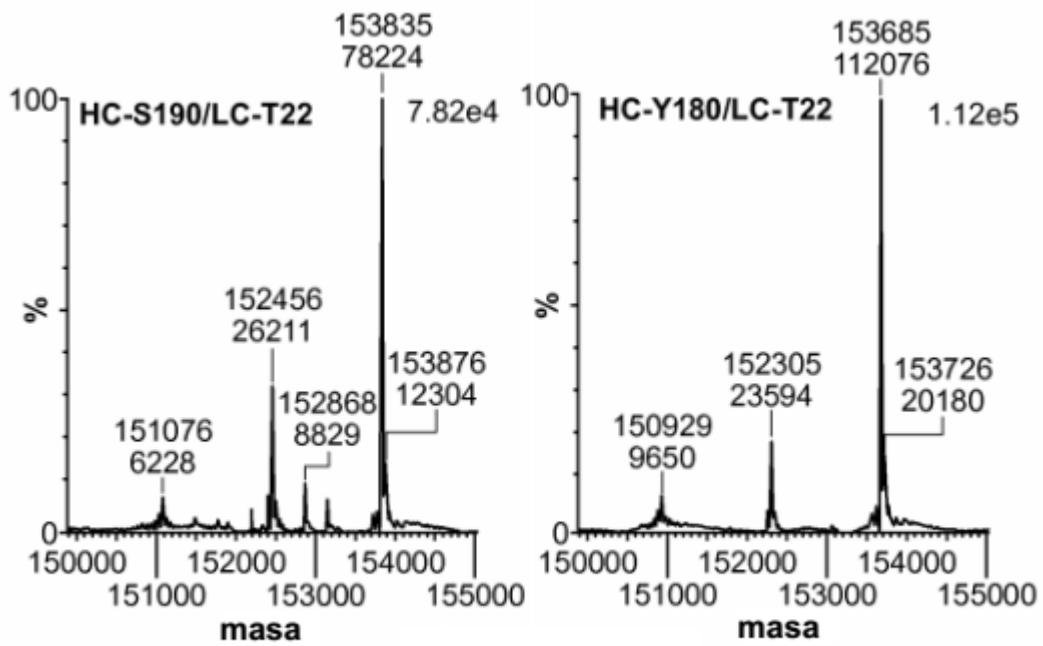


Figura 9F

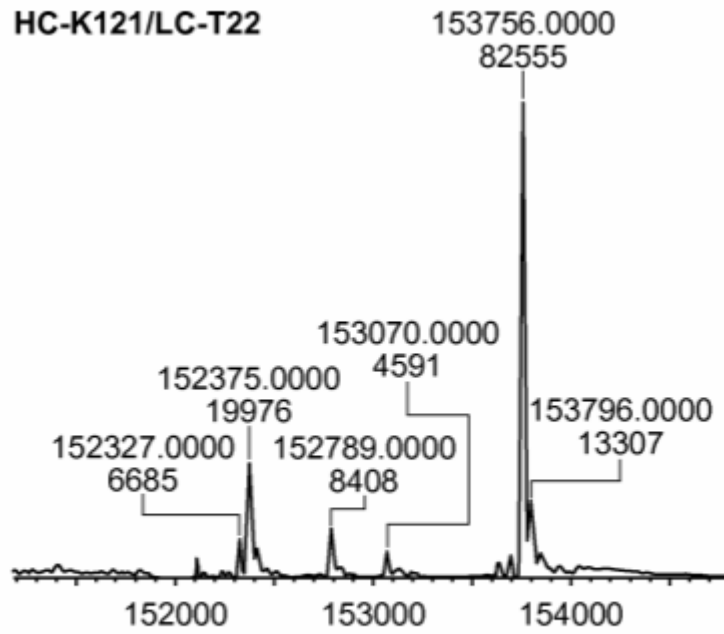


Figura 9G

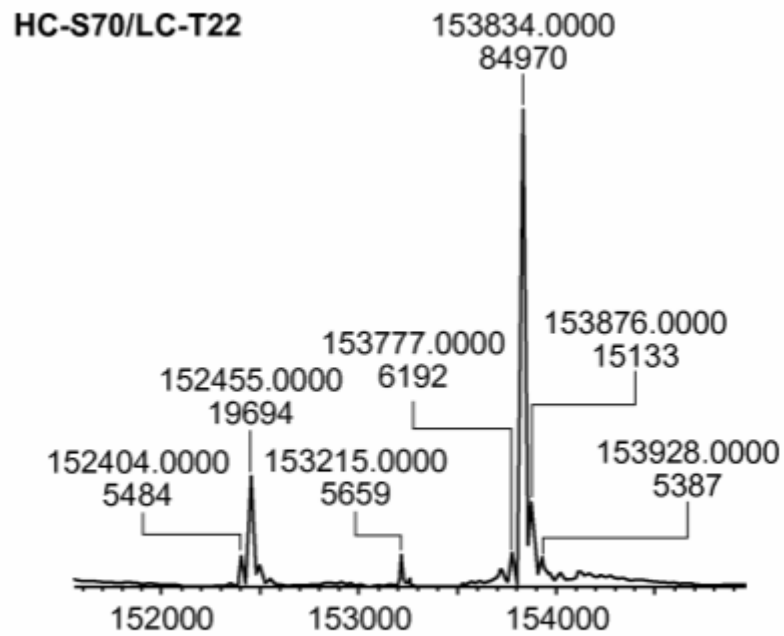


Figura 9H

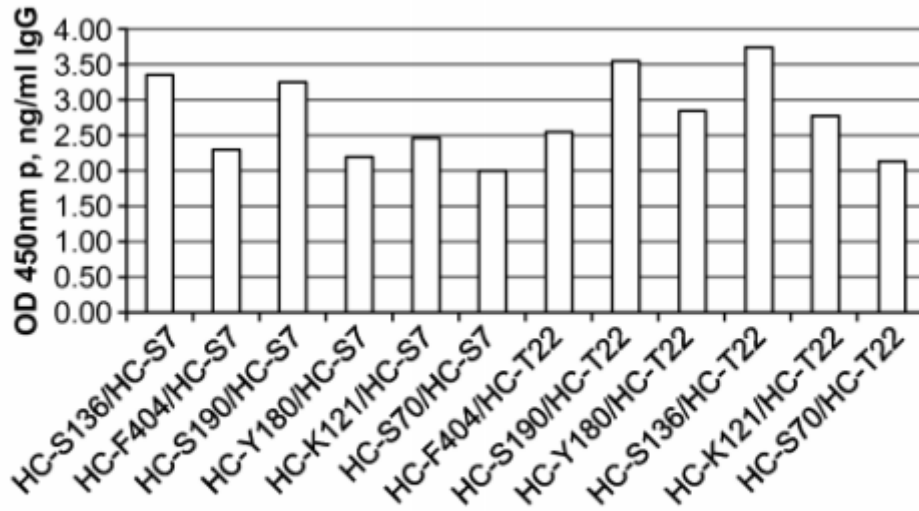


Figura 10

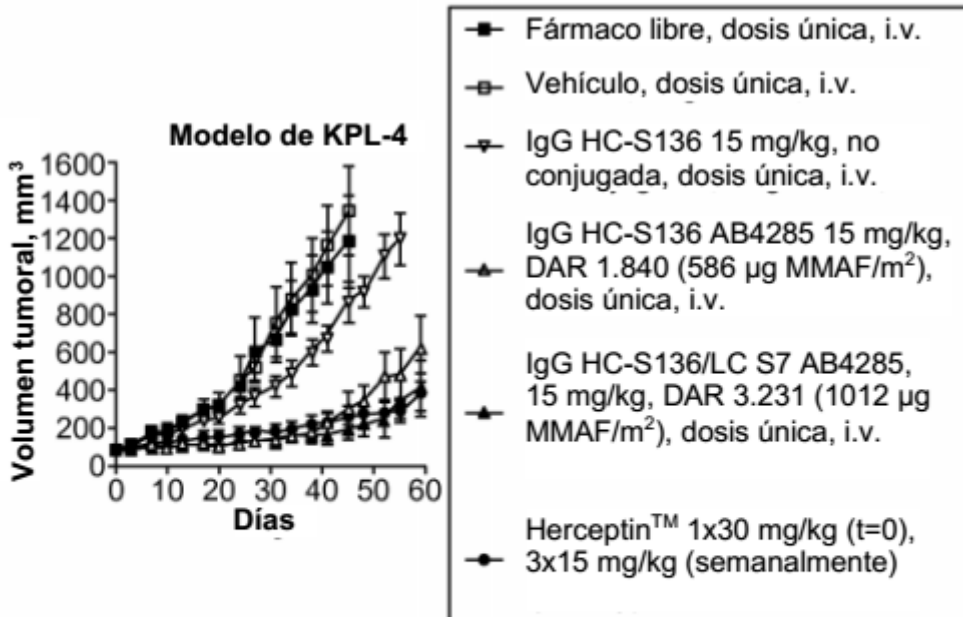


Figura 11

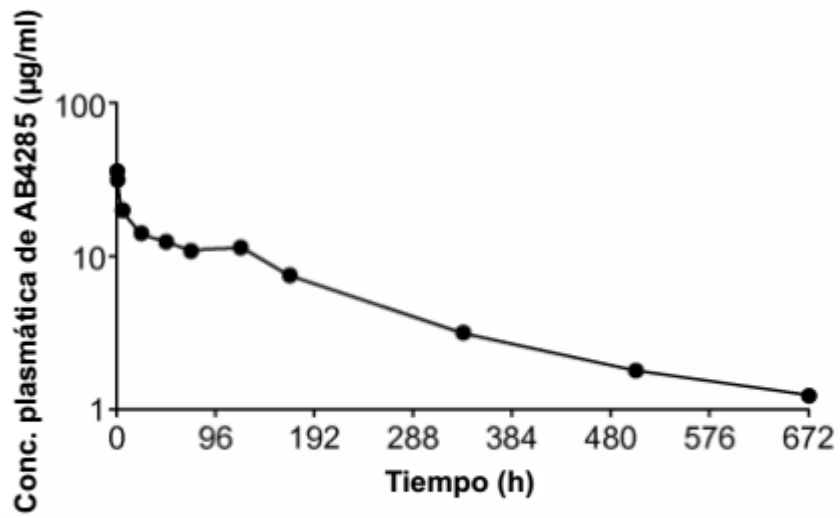


Figura 12

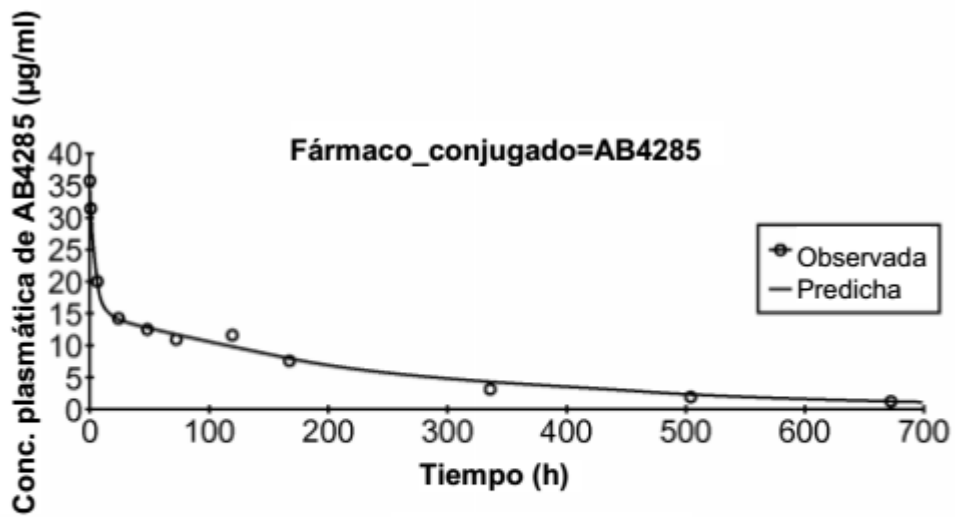


Figura 13

Figura 14

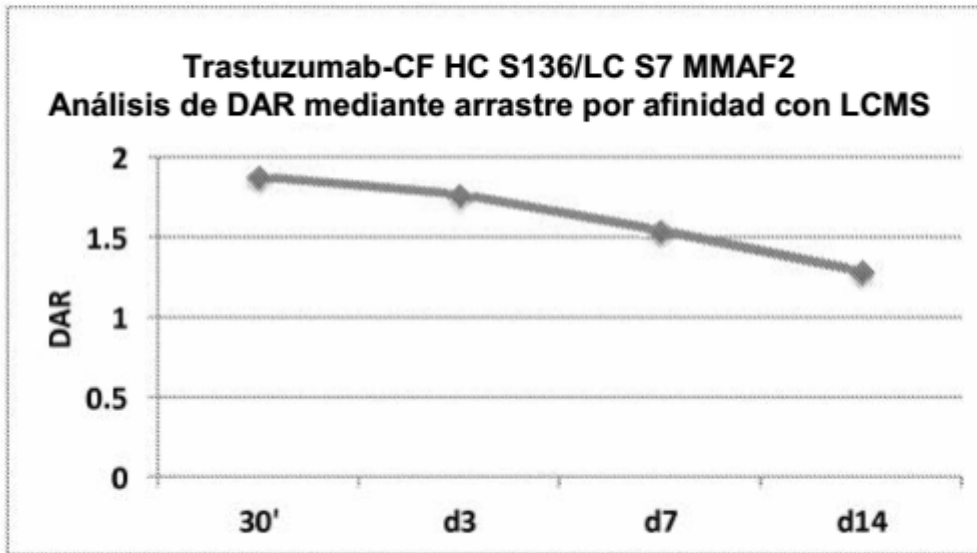
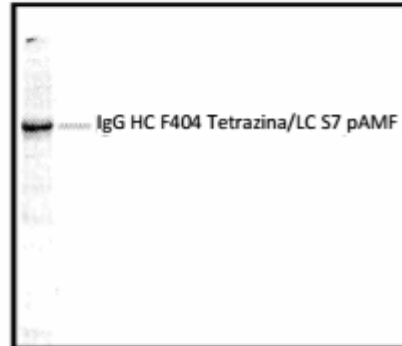
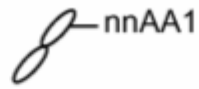


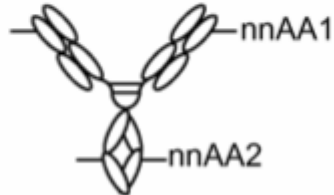
Figura 15



nnAA1 se incorporó a LC



nnAA2 se incorporó a HC en presencia de LC



IgG se conjugó con dos fármacos mediante dos químicas ortogonales

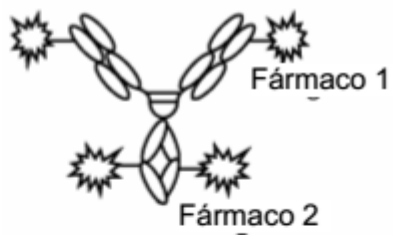


Figura 16