

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 993**

51 Int. Cl.:

**C07D 417/12** (2006.01)  
**C07D 207/08** (2006.01)  
**C07D 401/12** (2006.01)  
**A61K 31/427** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 5/02** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2012 PCT/US2012/039472**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12166560**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012 E 12793246 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2714684**

54 Título: **Composiciones que contienen y métodos que implican derivados de dolastatina enlazados con aminoácidos no naturales y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**27.05.2011 US 201161491146 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.11.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 690 993 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

Composiciones que contienen y métodos que implican derivados de dolastatina enlazados con aminoácidos no naturales y usos de los mismos

5

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

**[0001]** La capacidad de incorporar aminoácidos no genéticamente codificados (es decir, "aminoácidos no naturales") en proteínas permite la introducción de grupos funcionales químicos que podrían proporcionar alternativas valiosas a los grupos funcionales naturales, tales como el épsilon -NH<sub>2</sub> de lisina, el sulfhidrilo -SH de cisteína, el grupo imino de histidina, etc. Se sabe que ciertos grupos funcionales químicos son inertes a los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos codificados genéticamente, pero que reaccionan limpia y eficientemente para formar enlaces estables con grupos funcionales que pueden incorporarse a aminoácidos no naturales.

10

**[0002]** Los métodos ahora están disponibles para introducir selectivamente grupos funcionales químicos que no se encuentran en las proteínas, que son químicamente inertes a todos los grupos funcionales encontrados en los 20 aminoácidos genéticamente codificados, y que pueden usarse para reaccionar de manera eficiente y selectivamente con reactivos que comprenden ciertos grupos funcionales para formar enlaces covalentes estables.

15

Los documentos WO 03/043583 A2 y WO 2004/073656 A2 describen métodos para el tratamiento de trastornos inmunológicos usando anticuerpos anti-CD30. El documento WO 2004/073656 A2 describe conjugados de anticuerpo y fármaco de PSMA. El documento US 2009/047296 A1 describe conjugados de ligando de auristatina.

20

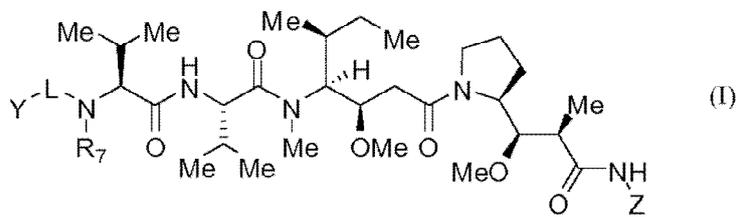
## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

**[0003]** En este documento, se describen restos tóxicos con uno o más engarce(s), grupos tóxicos unidos a aminoácidos no naturales y procedimientos para preparar tales aminoácidos y polipéptidos no naturales.

25

**[0004]** La presente invención describe un compuesto, o una sal del mismo, que comprende la Fórmula (I):

30



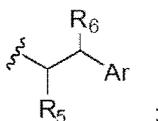
35

en donde:

40

Z tiene la estructura de:

45



50

R<sub>5</sub> es H, COR<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o tiazol;

R<sub>8</sub> es OH o -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>;

R<sub>6</sub> es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

55

R<sub>7</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o hidrógeno;

Y se selecciona del grupo que consiste en una hidroxilamina;

L es un engarce seleccionado del grupo que consiste en -alquileo-, -alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(Me)<sub>2</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-W-, -alquileo-C(O)-W-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-U-alquileo-C(O)-, y -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-U-alquileo-;

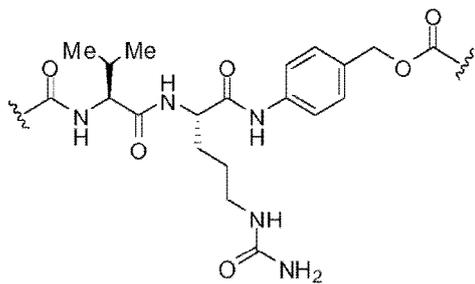
60

W tiene la estructura de:

65

5

10

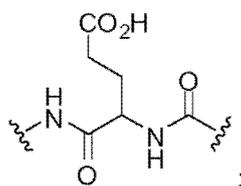


15

U tiene la estructura de:

20

25



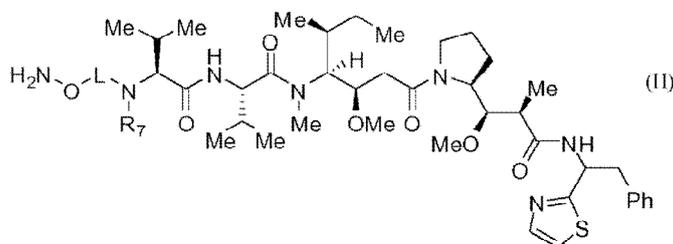
o L está ausente, Y es metilo, R<sub>5</sub> es COR<sub>8</sub>, y R<sub>8</sub> es -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>; y cada n, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores que o iguales a uno.

**[0005]** En algunas realizaciones, R<sub>5</sub> es tiazol. En otras realizaciones, R<sub>6</sub> es H. En ciertas realizaciones, Ar es fenilo. En realizaciones adicionales o adicionales, R<sub>7</sub> es metilo. En algunas realizaciones, n es un número entero de 0 a 20, de 0 a 10 o de 0 a 5.

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

35

40



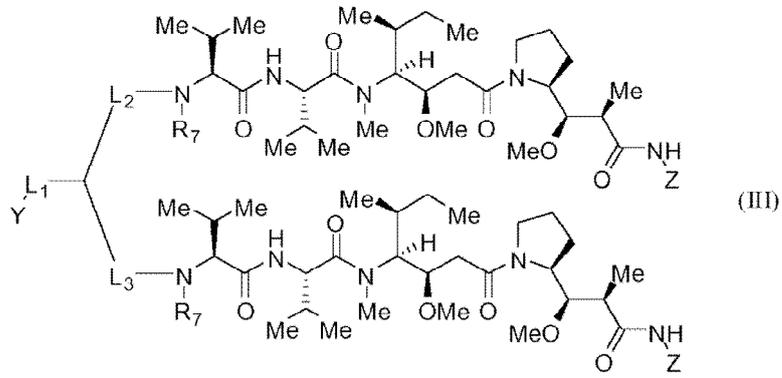
45

50

55

En ciertas realizaciones, L es -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-. En realizaciones específicas, cada alquileo es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, n es igual a 3, y R<sub>7</sub> es metilo. En otras realizaciones, L es -alquileo-. En realizaciones específicas, cada alquileo es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y R<sub>7</sub> es metilo o hidrógeno. En ciertas realizaciones, L es -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-C(O)-. En ciertas realizaciones específicas, cada alquileo es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, n es igual a 4, y R<sub>7</sub> es metilo. En realizaciones adicionales o alternativas, L es -(alquileo-O)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(Me)<sub>2</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-. En realizaciones específicas, cada alquileo es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, n es igual a 1, n' es igual a 2, n'' es igual a 1, n''' es igual a 2, n'''' es igual a 4, y R<sub>7</sub> es metilo. La presente invención también describe un compuesto, o una sal del mismo, que comprende la Fórmula (III), (IV), (V) o (VI):

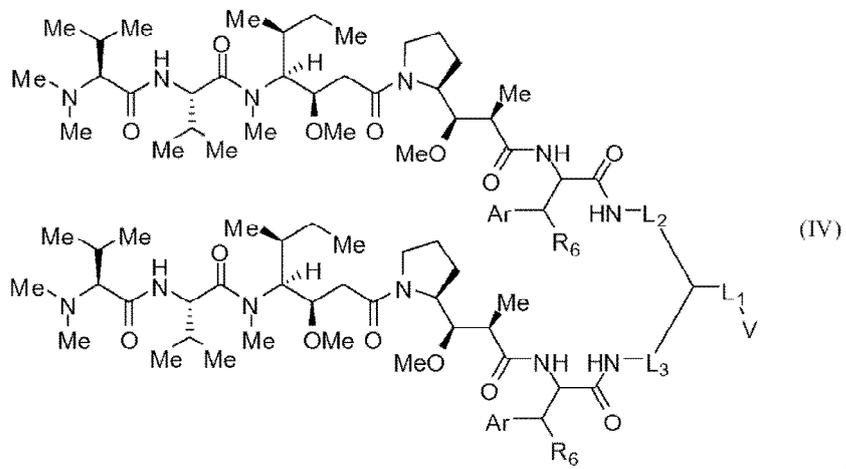
5



10

15

20

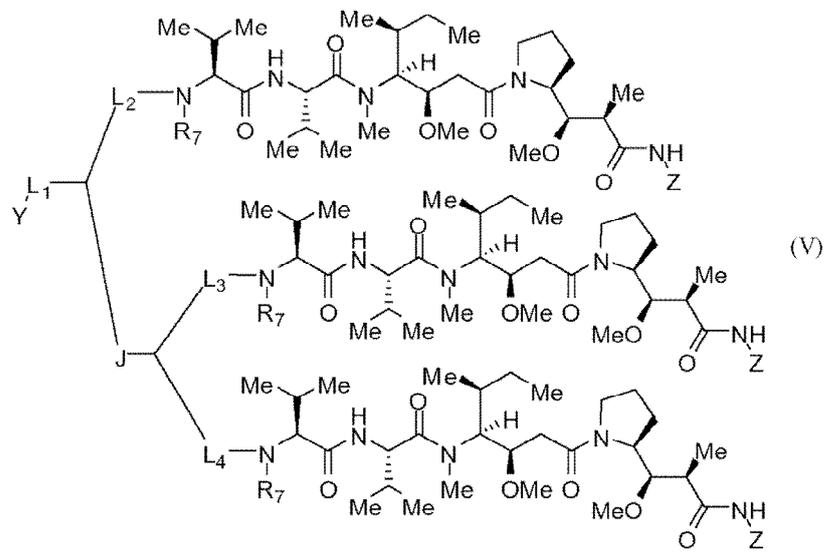


25

30

35

40



45

50

55

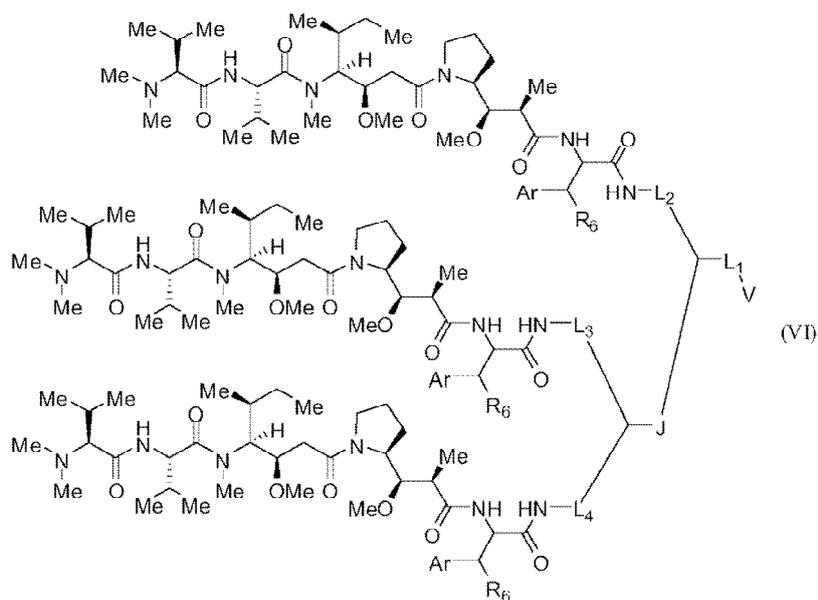
5

10

15

20

25

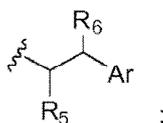


en donde:

30

Z tiene la estructura de:

35



40

R<sub>5</sub> es H, COR<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o tiazol;  
 R<sub>8</sub> es OH;  
 R<sub>6</sub> es OH o H;  
 Ar es fenilo o piridina;

45

R<sub>7</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o hidrógeno;

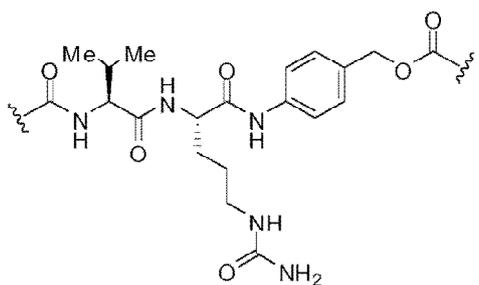
Y y V se seleccionan cada uno del grupo que consiste en una hidroxilamina;

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son cada uno de los enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en un enlace, -alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-, -alquileo'-J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J'-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-alquileo'-, -W-, -alquileo-W-, alquileo'-J-(alquileo-NMe)<sub>n</sub>-alquileo-W-, -J-(alquileo-NMe)<sub>n</sub>-alquileo-W-, -J-alquileo-NMe-alquileo-NMe-alquileo"-W-, y -alquileo-J-alquileo'-NMe-alquileo"-NMe-alquileo"-W-;

50

W tiene la estructura de:

55

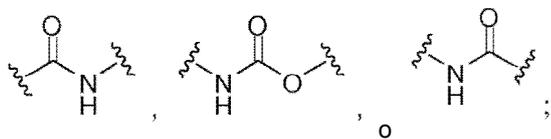


60

65

cada J y J' tienen independientemente la estructura de:

5

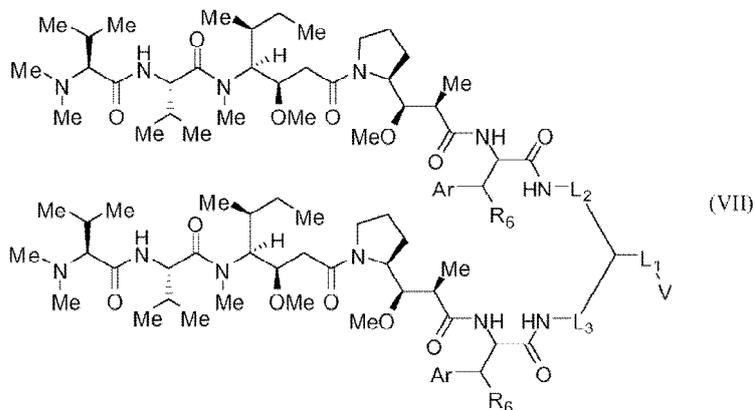


10

y cada n y n' son independientemente enteros mayores que o iguales a uno.

[0008] En ciertas realizaciones, se describe un compuesto que comprende la Fórmula (VII):

15



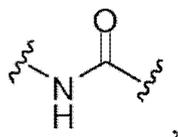
20

25

30

[0009] En ciertas realizaciones, L<sub>1</sub> es -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-, L<sub>2</sub> es -alquileo'-J'-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, L<sub>3</sub> es -J''-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, alquileo es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, alquileo' es -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, n es 1, n' y n'' son 3, J tiene la estructura de

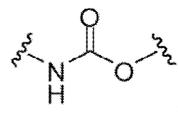
35



40

J' y J'' tienen la estructura de

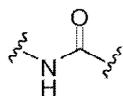
45



50

y R<sub>7</sub> es metilo. En otras realizaciones, L<sub>1</sub> es -J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, L<sub>2</sub> es -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J'-alquileo-', L<sub>3</sub> es -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J'', alquileo es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, alquileo' es -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, n es 1, n' y n'' son 4, y J, J' y J'' tiene la estructura de

55



60

[0010] En divulgaciones adicionales o alternativas, se describen métodos para detectar la presencia de un polipéptido en un paciente, comprendiendo el método la administración de un polipéptido que comprende al menos un aminoácido no natural que contiene heterociclo y el aminoácido no natural que contiene heterociclo resultante. El polipéptido modula la inmunogenicidad del polipéptido en relación con el polipéptido de aminoácidos homólogo de origen natural.

65

**[0011]** Debe entenderse que los métodos y composiciones descritas en este documento no están limitados a la metodología, protocolos, líneas celulares, construcciones y reactivos particulares descritos en la presente y, como tales, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de los métodos y composiciones descritas en este documento, que estarán limitadas únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

**[0012]** Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen una referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

**[0013]** A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por los expertos en la materia a los que pertenecen las invenciones descritas en este documento. Aunque cualquier método, dispositivo y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden usarse en la práctica o prueba de las invenciones descritas aquí, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen a continuación.

**[0014]** Las publicaciones discutidas en este documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo aquí contenido debe interpretarse como una admisión de que los inventores descritos en este documento no tienen derecho a anteceder tal divulgación en virtud de la invención anterior o por cualquier otra razón.

**[0015]** Los términos "enlace basado en aldol" o "enlace basado en aldol mixto" se refieren a la condensación catalizada por ácido o base de un compuesto de carbonilo con el enolato/enol de otro compuesto de carbonilo, que puede o no ser lo mismo, para generar un compuesto  $\beta$ -hidroxicarbonilo-un aldol.

**[0016]** El término "etiqueta de afinidad", como se usa en el presente documento, se refiere a una etiqueta que se une reversiblemente o irreversiblemente a otra molécula, ya sea para modificarla, destruirla o formar un compuesto con ella. A modo de ejemplo, las etiquetas de afinidad incluyen enzimas y sus sustratos, o anticuerpos y sus antígenos.

**[0017]** Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos a moléculas a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

**[0018]** El término "alquilo" por sí mismo o como parte de otra molécula significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarburo cíclico o de cadena lineal o ramificada, o una combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, monoinsaturado o poliinsaturado y puede incluir radicales di- y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> significa de uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, pero sin limitación, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexilo) metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butenilo, y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, también incluye aquellos derivados de alquilo definidos con más detalle en la presente memoria, tales como "heteroalquilo", "haloalquilo" y "homoalquilo".

**[0019]** El término "alquilenos" por sí mismo o como parte de otra molécula significa un radical divalente derivado de un alcano, como se ejemplifica, por (-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, en donde n puede ser de 1 a aproximadamente 24. A modo de ejemplo solamente, tales grupos incluyen, pero no se limitan a, grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono tales como las estructuras -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. Un "alquilo inferior" o "alquilenos inferior" es un grupo alquilo o alquilenos de cadena más corta, que generalmente tiene ocho o menos átomos de carbono. El término "alquilenos", a menos que se indique lo contrario, también pretende incluir aquellos grupos descritos aquí como "heteroalquilenos".

**[0020]** El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos codificados de forma natural son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, a modo de ejemplo solamente, un carbono  $\alpha$  que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (a modo de ejemplo, norleucina) o pueden tener esqueletos de péptidos modificados conservando al mismo tiempo la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Ejemplos no limitantes de análogos de aminoácidos incluyen homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, sulfonio de metilo de metionina.

**[0021]** Los aminoácidos se pueden referir a la presente memoria ya sea por su nombre, sus símbolos de tres letras

comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Además, los nucleótidos se pueden consultar mediante sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

5 **[0022]** Un "grupo de modificación amino terminal" se refiere a cualquier molécula que se puede unir a un grupo amino terminal. A modo de ejemplo, tales grupos de amina terminales pueden estar en el extremo de moléculas poliméricas, en donde tales moléculas poliméricas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos y polisacáridos. Los grupos de modificación del término incluyen, pero sin limitación, diversos polímeros, péptidos o proteínas solubles en agua. A modo de ejemplo solamente, los grupos de modificación del término incluyen polietilenglicol o albúmina de suero. Los grupos de modificación de los términos se pueden usar para modificar las características terapéuticas de la molécula polimérica, que incluyen, pero no se limitan a aumentar la vida media en suero de los péptidos.

15 **[0023]** Por "fragmento de anticuerpo" se entiende cualquier forma de un anticuerpo diferente de la forma de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpo en este documento incluyen anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de anticuerpos de longitud completa, y anticuerpos que se han diseñado. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no están limitados a Fv, Fc, Fab y (Fab')<sub>2</sub>, Fv de cadena única (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones marco, regiones constantes, cadenas pesadas, cadenas ligeras, y regiones variables, y andamios alternativos no anticuerpos, anticuerpos biespecíficos y similares (Maynard y Georgiou, 2000, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2: 339-76; Hudson, 1998, Curr. Opin. Biotechnol., 9: 395-402). Otra subestructura funcional es un Fv de cadena única (scFv), que comprende las regiones variables de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, unidas covalentemente por un conector peptídico (S-z Hu y col., 1996, Cancer Research, 56, 3055-3061). Estas proteínas pequeñas (Mr 25.000) generalmente retienen la especificidad y la afinidad por el antígeno en un único polipéptido y pueden proporcionar un elemento constructivo conveniente para moléculas más grandes, específicas de antígeno. A menos que se indique específicamente lo contrario, los enunciados y las reivindicaciones que usan el término "anticuerpo" o "anticuerpos" incluyen específicamente "fragmento de anticuerpo" y "fragmentos de anticuerpo".

30 **[0024]** Por "conjugado anticuerpo-fármaco" o "ADC", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de anticuerpo, o fragmento de la misma, que está covalentemente unida a una o más molécula(s) biológicamente activa(s). La molécula biológicamente activa puede ser conjugada al anticuerpo a través de un enlazador, polímero u otro enlace covalente.

35 **[0025]** El término "aromático" o "arilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a una estructura de anillo cerrado que tiene al menos un anillo que tiene un sistema de electrones pi conjugado e incluye tanto arilo carbocíclico como arilo heterocíclico (o "heteroarilo" o "grupos heteroarmicos"). El grupo aromático carbocíclico o heterocíclico puede contener de 5 a 20 átomos en el anillo. El término incluye anillos monocíclicos unidos de forma covalente o grupos policíclicos de anillos condensados (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono). Un grupo aromático puede ser no sustituido o sustituido. Los ejemplos no limitantes de grupos "aromáticos" o "arilo" incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, antraceno y fenantraceno. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos en este documento.

45 **[0026]** Por brevedad, el término "aromático" o "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (que incluyen, pero no se limitan a, ariloxi, ariltioxi, aralquilo) incluye tanto anillos arilo como heteroarilo como se definió anteriormente. Por tanto, el término "aralquilo" o "alcarilo" pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (que incluye, pero no se limita a, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluidos aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (que incluye, pero no se limita a, un grupo metileno) ha sido reemplazado por un heteroátomo, a modo de ejemplo solamente, por un átomo de oxígeno. Los ejemplos de dichos grupos arilo incluyen, pero sin limitación, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo y similares.

55 **[0027]** El término "arileno", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical arilo divalente. Los ejemplos no limitantes de "arileno" incluyen fenileno, piridinileno, pirimidinileno y tiofenileno. Los sustituyentes para grupos arileno se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos en este documento.

60 **[0028]** Un "polímero bifuncional", también denominado "engarce bifuncional", se refiere a un polímero que comprende dos grupos funcionales que son capaces de reaccionar específicamente con otros restos para formar enlaces covalentes o no covalentes. Dichos restos pueden incluir, aunque sin limitación, los grupos laterales de aminoácidos o péptidos naturales o no naturales que contienen tales aminoácidos naturales o no naturales. Los otros restos que pueden estar unidos al enlazador bifuncional o al polímero bifuncional pueden ser los mismos o diferentes restos. A modo de ejemplo solamente, un enlazador bifuncional puede tener un grupo funcional reactivo con un grupo en un primer péptido, y otro grupo funcional que es reactivo con un grupo en un segundo péptido, formando un conjugado que incluye el primer péptido, el enlazador bifuncional y el segundo péptido. Se conocen muchos procedimientos y moléculas de enlace para la unión de diversos compuestos a péptidos. Véase, por

ejemplo, la Solicitud de Patente Europea N° 188.256; Patentes de Estados Unidos N°s. 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; y 4.569.789. Un "polímero multifuncional" también denominado "engarce multifuncional", se refiere a un polímero que comprende dos o más grupos funcionales que son capaces de reaccionar con otros restos. Dichos restos pueden incluir, aunque sin limitación, los grupos laterales de aminoácidos o péptidos naturales o no naturales que contienen tales aminoácidos naturales o no naturales. (incluidos, entre otros, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un polímero bifuncional o polímero multifuncional puede ser de cualquier longitud o peso molecular deseados, y puede seleccionarse para proporcionar un espaciado deseado particular o conformación entre una o más moléculas unidas a un compuesto y moléculas a las que se une o al compuesto.

**[0029]** El término "biodisponibilidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la velocidad y al grado en que una sustancia o su resto activo se suministra desde una forma de dosificación farmacéutica y está disponible en el sitio de acción o en la circulación general. Los aumentos en la biodisponibilidad se refieren a aumentar la velocidad y el grado en que una sustancia o su resto activo se libera desde una forma de dosificación farmacéutica y está disponible en el sitio de acción o en la circulación general. A modo de ejemplo, un aumento en la biodisponibilidad puede estar indicado como un aumento en la concentración de la sustancia o su resto activo en la sangre en comparación con otras sustancias o restos activos. Un ejemplo no limitante de un método para evaluar los aumentos en la biodisponibilidad se da en los ejemplos 21-25. Este método puede usarse para evaluar la biodisponibilidad de cualquier polipéptido.

**[0030]** El término "molécula biológicamente activa", "resto biológicamente activo" o "agente biológicamente activo" cuando se usa en el presente documento significa cualquier sustancia que puede afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema biológico, vía, molécula o interacción relacionada con un organismo, incluidos, entre otros, virus, bacterias, bacteriófagos, transposones, priones, insectos, hongos, plantas, animales y humanos. En particular, como se usa en el presente documento, las moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, cualquier sustancia destinada a diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades en humanos u otros animales, o para mejorar el bienestar físico o mental de los seres humanos o animales. Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de moléculas pequeñas, fármacos duros, fármacos blandos, profármacos, carbohidratos, átomos o moléculas inorgánicas, colorantes, lípidos, nucleósidos, radionucleidos, oligonucleótidos, toxinas, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Las clases de agentes biológicamente activos que son adecuados para su uso con los métodos y composiciones descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, fármacos, profármacos, radionucleidos, agentes de formación de imágenes, polímeros, antibióticos, fungicidas, agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes antitumorales, agentes cardiovasculares, agentes ansiolíticos, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos, toxinas derivadas de microbios y similares.

**[0031]** Por "actividad biológica moduladora" se entiende aumentar o disminuir la reactividad de un polipéptido, alterando la selectividad del polipéptido, potenciando o disminuyendo la selectividad del sustrato del polipéptido. El análisis de la actividad biológica modificada se puede realizar comparando la actividad biológica del polipéptido no natural con la del polipéptido natural.

**[0032]** El término "biomaterial", como se usa en este documento, se refiere a un material derivado biológicamente, que incluye, pero no se limita a, material obtenido de biorreactores y/o a partir de métodos y técnicas recombinantes.

**[0033]** El término "sonda biofísica", como se usa en este documento, se refiere a sondas que pueden detectar o controlar cambios estructurales en moléculas. Tales moléculas incluyen, pero sin limitación, proteínas y la "sonda biofísica" puede usarse para detectar o controlar la interacción de proteínas con otras macromoléculas. Los ejemplos de sondas biofísicas incluyen, pero no se limitan a, marcadores de espín, fluoróforos y grupos fotoactivables.

**[0034]** El término "biosintéticamente", como se usa en este documento, se refiere a cualquier método que utiliza un sistema de traducción (celular o no celular), que incluye el uso de al menos uno de los siguientes componentes: un polinucleótido, un codón, un ARNt y un ribosoma. A modo de ejemplo, los aminoácidos no naturales pueden ser "incorporados biosintéticamente" en polipéptidos de aminoácidos no naturales usando los métodos y técnicas descritas en la presente memoria, "generación in vivo de polipéptidos que comprenden aminoácidos no naturales", y en el ejemplo no limitante 20. Adicionalmente, los métodos para la selección de aminoácidos no naturales útiles que pueden ser incorporados "biosintéticamente" en polipéptidos de aminoácidos no naturales se describen en los ejemplos no limitantes 20.

**[0035]** El término "análogo de biotina", o también denominado "imitador de biotina", como se usa en este documento, es cualquier molécula, distinta de biotina, que se une con alta afinidad a avidina y/o estreptavidina.

**[0036]** El término "carbonilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que contiene un resto seleccionado del grupo que consiste en -C(O)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>- y -C(S)-, que incluyen, pero no se limitan a, grupos que contienen al menos un grupo cetona y/o al menos un grupo aldehído, y/o al menos un grupo éster, y/o al menos un grupo ácido carboxílico, y/o al menos un grupo tioéster. Dichos grupos carbonilo incluyen cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres y tioésteres. Además, dichos grupos pueden ser parte de moléculas lineales,

ramificadas o cíclicas.

**[0037]** El término "grupo de modificación del término carboxi" se refiere a cualquier molécula que pueda unirse a un grupo carboxi terminal. A modo de ejemplo, dichos grupos carboxi terminales pueden estar en el extremo de las moléculas poliméricas, en donde tales moléculas poliméricas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos y polisacáridos. Los grupos de modificación del término incluyen, pero sin limitación, diversos polímeros, péptidos o proteínas solubles en agua. A modo de ejemplo solamente, los grupos de modificación del término incluyen polietilenglicol o albúmina de suero. Los grupos de modificación de los términos se pueden usar para modificar las características terapéuticas de la molécula polimérica, que incluyen, pero no se limitan a aumentar la vida media en suero de los péptidos.

**[0038]** El término "grupo escindible químicamente", también denominado "químicamente lábil", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que se rompe o escinde tras la exposición a ácido, base, agentes oxidantes, agentes reductores, iniciadores químicos o iniciadores radicales.

**[0039]** El término "grupo quimioluminiscente", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que emite luz como resultado de una reacción química sin la adición de calor. A modo de ejemplo solamente, el luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona) reacciona con oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en presencia de una base y un catalizador metálico para producir un producto de estado excitado (3-aminoftalato, 3-APA).

**[0040]** El término "cromóforo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que absorbe luz de longitudes de onda visibles, longitudes de onda de UV o longitudes de onda de IR.

**[0041]** El término "cofactor", como se usa en este documento, se refiere a un átomo o molécula esencial para la acción de una molécula grande. Los cofactores incluyen, entre otros, iones inorgánicos, coenzimas, proteínas o algún otro factor necesario para la actividad de las enzimas. Los ejemplos incluyen, hemo en hemoglobina, magnesio en clorofila e iones metálicos para proteínas.

**[0042]** "Coplegamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a procesos de replegamiento, reacciones o métodos que emplean al menos dos moléculas que interaccionan entre sí y dan como resultado la transformación de moléculas plegadas incorrectamente o plegadas a moléculas plegadas adecuadamente. A modo de ejemplo solamente, "coplegamiento", emplean al menos dos polipéptidos que interaccionan entre sí y dan como resultado la transformación de polipéptidos desplegados o incorrectamente plegados a polipéptidos nativos plegados apropiadamente. Tales polipéptidos pueden contener aminoácidos naturales y/o al menos un aminoácido no natural.

**[0043]** Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de cualquiera de las posiciones contiguas usadas para comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de forma óptima. Dichas posiciones contiguas incluyen, pero no se limitan a, un grupo que consta de aproximadamente 20 a aproximadamente 600 unidades secuenciales, que incluyen aproximadamente 50 a aproximadamente 200 unidades secuenciales, y aproximadamente 100 a aproximadamente 150 unidades secuenciales. A modo de ejemplo solamente, tales secuencias incluyen polipéptidos y polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales, mientras que las unidades secuenciales incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos naturales y no naturales. Además, a modo de ejemplo solamente, tales secuencias incluyen polinucleótidos con nucleótidos que son las unidades secuenciales correspondientes. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, que incluye, pero no se limita a, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Mates. 2: 482c, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (ver, por ejemplo, Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology (1995)).

**[0044]** A modo de ejemplo, un algoritmo que puede usarse para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25: 3389 - 3402, y Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 89: 10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST normalmente se realiza estando el filtro de "baja complejidad" desactivado.

**[0045]** El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por

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

**[0046]** El término "variantes conservativamente modificadas" se aplica tanto a aminoácidos naturales como no naturales y a secuencias de ácidos nucleicos naturales y no naturales, y combinaciones de los mismos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, "variantes modificadas conservativamente" se refiere a aquellos ácidos nucleicos naturales y no naturales que codifican secuencias de aminoácidos naturales y no naturales idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico natural y no natural no codifica una secuencia de aminoácidos natural y no natural, a secuencias esencialmente idénticas. A modo de ejemplo, debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones conservativamente modificadas. De este modo, a modo de ejemplo, cada secuencia de ácido nucleico natural o no natural de la presente invención que codifica un polipéptido natural o no natural también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico natural o no natural. Un experto en la materia reconocerá que cada codón en un ácido nucleico natural o no natural (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano) se puede modificar a producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico natural y no natural que codifica un polipéptido natural y no natural está implícita en cada secuencia descrita.

**[0047]** En cuanto a secuencias de aminoácidos, sustituciones, deleciones o adiciones individuales a un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia proteica que altera, agrega o elimina un único aminoácido natural y no natural o un pequeño porcentaje de aminoácidos naturales y no naturales en la secuencia codificada es una "variante conservativamente modificada" donde la alteración resulta en la eliminación de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido natural y no natural por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos naturales funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes conservativamente modificadas son además de, y no excluyen, variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de los métodos y composiciones descritas en este documento.

**[0048]** Las tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son conocidas por los expertos en la técnica. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W);
- 7) Serina(s), treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), metionina (M)

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

**[0049]** Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a no ser que se declare expresamente, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Por tanto, un cicloalquilo o heterocicloalquilo incluyen enlaces de anillo saturados, parcialmente saturados y plenamente saturados. Adicionalmente, para el heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo se conecta al resto de la molécula. El heteroátomo puede incluir, pero no se limita a, oxígeno, nitrógeno o sulfuro. Ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofurano-2-ilo, tetrahidrofurano-3-ilo, tetrahidrotieno-2-ilo, tetrahidrotieno-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares. Además, el término abarca estructuras multicíclicas, que incluyen, pero no se limitan a, estructuras cíclicas bicíclicas y tricíclicas. De manera similar, el término "heterocicloalquileno" por sí mismo o como parte de otra molécula significa un radical divalente derivado de heterocicloalquilo, y el término "cicloalquileno" por sí mismo o como parte de otra molécula significa un radical divalente derivado de cicloalquilo.

**[0050]** El término "ciclodextrina", como se usa en el presente documento, se refiere a carbohidratos cíclicos que consisten en al menos de seis a ocho moléculas de glucosa en una formación de anillo. La parte exterior del anillo contiene grupos solubles en agua; en el centro del anillo hay una cavidad relativamente no polar capaz de acomodar moléculas pequeñas.

5 **[0051]** El término "citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que daña las células.

10 **[0052]** "Agente desnaturizante" o "desnaturizante", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto o material que causará un despliegue reversible de un polímero. A modo de ejemplo solamente, "agente desnaturizante" o "desnaturizantes" pueden causar un despliegue reversible de una proteína. La resistencia de un agente desnaturizante o desnaturizante se determinará tanto por las propiedades como por la concentración del agente desnaturizante o desnaturizante particular. A modo de ejemplo, los agentes desnaturizantes o desnaturizantes incluyen, pero no se limitan a, caotropos, detergentes, disolventes orgánicos miscibles en agua, fosfolípidos o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de caotropos incluyen, pero sin limitación, urea, guanidina y tiocianato de sodio. Los ejemplos no limitantes de detergentes pueden incluir, entre otros, detergentes fuertes tales como dodecilsulfato de sodio o éteres de polioxietileno (por ejemplo, detergentes Tween o Triton), sarcosilo, detergentes suaves no iónicos (por ejemplo, digitonina), detergentes catiónicos suaves, tales como N->2,3-(dioleoxi)-propilo-N,N,N-trimetilamonio, detergentes iónicos suaves (por ejemplo, colato de sodio o desoxicolato de sodio) o detergentes de ion híbrido, que incluyen pero no se limitan a sulfobetainas (Zwittergent), 3-(3-clorolamidopropilo)dimetilamonio-1-sulfato de propano (CHAPS), y 3-(3-clorolamidopropilo)dimetilamonio-2-hidroxil-1-sulfonato de propano (CHAPSO). Los ejemplos no limitantes de disolventes miscibles en agua orgánicos incluyen, pero no están limitados a, acetonitrilo, alcoholes inferiores (especialmente alcoholes C<sub>2</sub> - C<sub>4</sub> tales como etanol o isopropanol), o alcanodiolos inferiores (alcanodiolos C<sub>2</sub> - C<sub>4</sub> tales como etilenglicol) pueden ser utilizados como desnaturizantes. Los ejemplos no limitantes de fosfolípidos incluyen, pero sin limitación, fosfolípidos naturales tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol o derivados de fosfolípidos sintéticos o variantes tales como dihexanoilfosfatidilcolina o diheptanoilfosfatidilcolina.

30 **[0053]** El término "funcionalidad deseada" como se usa en este documento se refiere a cualquier grupo seleccionado de una etiqueta; un tinte; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotoreticulante; un compuesto citotóxico; una droga; una etiqueta de afinidad; una etiqueta de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo polipeptídico; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; una etiqueta de giro; un fluoróforo; un resto que contiene un metal; un resto radiactivo; un nuevo grupo funcional; un grupo que interactúa covalente o no covalentemente con otras moléculas; un resto fotografiado; un resto excitable por radiación actínica; un ligando; un resto fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; un resto que incorpora un átomo pesado; un grupo escindible químicamente; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente activo redox; un amino tioácido; un resto tóxico; un resto marcado isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrón denso; un grupo magnético; un grupo intercalado; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo (en cuyo caso, el agente biológicamente activo puede incluir un agente con actividad terapéutica y el polipéptido de aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado puede servir como agente co-terapéutico con el agente terapéutico unido o como un medio para administrar el agente terapéutico a un sitio deseado dentro de un organismo); una etiqueta detectable; una pequeña molécula; un ácido ribonucleico inhibidor; un radionucleótido; un agente de captura de neutrones; un derivado de biotina; puntos cuánticos); un nanotransmisor; un radiotransmisor; una abzyme, un activador complejo activado, un virus, un adyuvante, un aglutinante, un alergeno, una angiotensina, una antihormona, un antioxidante, un aptámero, un ARN guía, una saponina, un vector lanzadera, una macromolécula, un mimotopo, un receptor, una micela inversa, y cualquier combinación de los mismos.

55 **[0054]** El término "diamina", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos/moléculas que comprenden al menos dos grupos funcionales amina, que incluyen, pero no se limitan a, un grupo hidrazina, un grupo amidina, un grupo imina, un grupo 1,1-diamina, un grupo 1,2-diamina, un grupo 1,3-diamina y un grupo 1,4-diamina. Además, dichos grupos pueden ser parte de moléculas lineales, ramificadas o cíclicas.

60 **[0055]** El término "marcador detectable", como se usa en el presente documento, se refiere a un marcador que puede observarse usando técnicas analíticas que incluyen, pero no se limitan a, fluorescencia, quimioluminiscencia, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de absorción ultravioleta/visible, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, resonancia magnética y métodos electroquímicos.

65 **[0056]** El término "dicarbonilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que contiene al menos dos restos seleccionados del grupo que consiste en -C(O)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, y -C(s)-, que incluye, entre otros, grupos 1,2-dicarbonilo, grupos 1,3-dicarbonilo y 1,4-dicarbonilo, y grupos que contienen al menos un grupo cetona, y/o al menos un grupo aldehído, y/o al menos un grupo éster, y/o al menos un grupo ácido carboxílico y/o al menos un grupo tioéster. Tales grupos dicarbonilo incluyen dicetonas, cetoaldehídos, cetoácidos, cetoésteres y

quetotioésteres. Además, dichos grupos pueden ser parte de moléculas lineales, ramificadas o cíclicas. Los dos restos en el grupo dicarbonilo pueden ser iguales o diferentes, y pueden incluir sustituyentes que producirían, a modo de ejemplo solamente, un éster, una cetona, un aldehído, un tioéster o una amida, en cualquiera de los dos restos .

5 **[0057]** El término "fármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia usada en la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o cura de una enfermedad o afección.

**[0058]** El término "colorante", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia colorante soluble que contiene un cromóforo.

10 **[0059]** El término "cantidad efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad suficiente de un agente o compuesto que es administrado que aliviará hasta cierto punto uno o más de los síntomas de la enfermedad o condición que se está tratando. El resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. A modo de ejemplo, un agente o un compuesto que se administra incluye, pero no se limita a, un polipéptido de aminoácido natural, un polipéptido de aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural modificado o un polipéptido no aminoácido modificado. Las composiciones que contienen tales polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados pueden administrarse para tratamientos profilácticos, potenciadores y/o terapéuticos. Una cantidad "efectiva" apropiada en cualquier caso individual se puede determinar usando técnicas, como un estudio de escalamiento de dosis.

25 **[0060]** El término "grupo electrón denso", como se usa en este documento, se refiere a un grupo que dispersa electrones cuando se irradia con un haz de electrones. Tales grupos incluyen, pero no se limitan a, molibdato de amonio, yoduro de bismuto subnitrito de cadmio, 99%, carbohidrazida, hexahidrato de cloruro férrico, tetramina de hexametileno, 98,5%, anhidro de tricloruro de indio, nitrato de lantano, trihidrato de acetato de plomo, trihidrato de citrato de plomo, nitrato de plomo, ácido periódico, ácido fosfomolibdico, ácido fosfotúngstico, ferricianuro de potasio, ferrocianuro de potasio, rojo de rutenio, nitrato de plata, proteinato de plata (ensayo de Ag: 8,0-8,5%) tetrafenilporfina de plata "fuerte" (S-TPPS), cloroaurato de sodio, tungstato de sodio, nitrato de talio, tiosemicarbazida (TSC), acetato de uranilo, nitrato de uranilo y sulfato de vanadilo.

35 **[0061]** El término "agente de transferencia de energía", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que puede donar o aceptar energía de otra molécula. A modo de ejemplo solamente, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) es un proceso de acoplamiento dipolo-dipolo mediante el cual la energía del estado excitado de una molécula donadora de fluorescencia se transfiere de forma no radiactiva a una molécula aceptora no inactivada que emite fluorescentemente la energía donada a una longitud de onda más larga.

40 **[0062]** Los términos "potenciar" o "potenciador" significan aumentar o prolongar en potencia o en duración un efecto deseado. A modo de ejemplo, "potenciar" el efecto de los agentes terapéuticos se refiere a la capacidad de aumentar o prolongar, en potencia o duración, el efecto de los agentes terapéuticos durante el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Una "cantidad eficaz potenciadora", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad adecuada para potenciar el efecto de un agente terapéutico en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Cuando se usa en un paciente, las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o condición, terapia previa, estado de salud del paciente y respuesta a los medicamentos, y el juicio del médico tratante.

50 **[0063]** Como se usa en el presente documento, el término "eucariota" se refiere a organismos que pertenecen al dominio filogenético Eucarya, que incluyen pero no se limitan a animales (que incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluyendo pero no limitado a, monocotiledóneas, dicotiledóneas y algas), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios y protistas.

**[0064]** El término "ácido graso", como se usa en el presente documento, se refiere a ácidos carboxílicos con aproximadamente una cadena lateral de hidrocarburo de aproximadamente C6 o más.

55 **[0065]** El término "fluoróforo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que, al excitarse, emite fotones y de ese modo es fluorescente.

60 **[0066]** Los términos "grupo funcional", "resto activo", "grupo activador", "grupo saliente", "sitio reactivo", "grupo químicamente reactivo" y "resto químicamente reactivo", como se usan en el presente documento, se refieren a porciones o unidades de una molécula en la que se producen reacciones químicas. Los términos son algo sinónimos en las técnicas químicas y se usan en este documento para indicar las porciones de moléculas que realizan alguna función o actividad y son reactivas con otras moléculas.

65 **[0067]** El término "halógeno" incluye flúor, cloro, yodo y bromo.

**[0068]** El término "haloacilo", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos acilo que contienen restos

halógenos, incluidos, pero no limitados a,  $-C(O)CH_3$ ,  $-C(O)CF_3$ ,  $-C(O)CH_2OCH_3$  y similares.

**[0069]** El término "haloalquilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a grupos alquilo que contienen restos halógenos, que incluyen, pero no se limitan a,  $-CF_3$  y  $-CH_2CF_3$  y similares.

**[0070]** El término "heteroalquilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a radicales hidrocarbonados cíclicos o de cadena lineal o ramificada, o combinaciones de los mismos, que consisten en un grupo alquilo y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los heteroátomo(s) O, N y S y Si pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a,  $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ ,  $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$ ,  $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$ ,  $-CH_2-S-CH_2-CH_3$ ,  $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$ ,  $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$ ,  $-CH=CH-O-CH_3$ ,  $-Si(CH_3)_3$ ,  $-CH_2-CH=N-OCH_3$ , y  $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ . Además, hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, a modo de ejemplo,  $-CH_2-NH-OCH_3$  y  $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ .

**[0071]** Los términos "enlace basado en heterociclo" o "enlace heterociclo" se refieren a un resto formado a partir de la reacción de un grupo dicarbonilo con un grupo diamina. El producto de reacción resultante es un heterociclo, que incluye un grupo heteroarilo o un grupo heterocicloalquilo. El grupo heterociclo resultante sirve como un enlace químico entre un aminoácido no natural o un polipéptido de aminoácido no natural y otro grupo funcional. En una realización, el enlace de heterociclo incluye un enlace de heterociclo que contiene nitrógeno, que incluye a modo de ejemplo solamente un enlace de pirazol, un enlace de pirrol, un enlace de indol, un enlace de benzodiazepina y un enlace de pirazulona.

**[0072]** De manera similar, el término "heteroalquileno" se refiere a un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica, pero no está limitado por,  $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$  y  $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ . Para grupos heteroalquileno, los heteroátomos iguales o diferentes también pueden ocupar cualquiera o ambos extremos de la cadena (que incluyen, pero no se limitan a, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino, aminooxialquileno y similares). Aún más, para grupos de enlace alquileno y heteroalquileno, no está implicada ninguna orientación del grupo de enlace por la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo de enlace. A modo de ejemplo, la fórmula  $-C(O)_2R'$  representa tanto  $-C(O)_2R'$  como  $-R'C(O)_2-$ .

**[0073]** El término "heteroarilo" o "heteroaromático", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos arilo que contienen al menos un heteroátomo seleccionado entre N, O y S; en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el (los) átomo(s) de nitrógeno puede(n) estar opcionalmente cuaternizado(s). Los grupos heteroarilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Un grupo heteroarilo puede unirse al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos heteroarilo incluyen 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenilo-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo, y 6-quinolilo.

**[0074]** El término "homoalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos alquilo que son grupos hidrocarbonados.

**[0075]** El término "idéntico", como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas. Además, el término "sustancialmente idéntico", como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más secuencias que tienen un porcentaje de unidades secuenciales que son las mismas cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada medida usando algoritmos de comparación o por alineación manual e inspección visual. A modo de ejemplo solamente, dos o más secuencias pueden ser "sustancialmente idénticas" si las unidades secuenciales son aproximadamente 60% idénticas, aproximadamente 65% idénticas, aproximadamente 70% idénticas, aproximadamente 75% idénticas, aproximadamente 80% idénticas, aproximadamente 85% idénticas, aproximadamente 90% idénticas, o aproximadamente 95% idénticas en una región específica. Dichos porcentajes para describir el "porcentaje de identidad" de dos o más secuencias. La identidad de una secuencia puede existir en una región que tiene al menos aproximadamente 75-100 unidades secuenciales de longitud, en una región que tiene aproximadamente 50 unidades secuenciales de longitud, o, cuando no se especifica, en toda la secuencia. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. A modo de ejemplo solamente, dos o más secuencias polipeptídicas son idénticas cuando los residuos aminoácidos son iguales, mientras que dos o más secuencias polipeptídicas son "sustancialmente idénticas" si los residuos aminoácidos son aproximadamente 60% idénticas, aproximadamente 65% idénticas, aproximadamente 70% idénticas, aproximadamente 75% idénticas, aproximadamente 80% idénticas, aproximadamente 85% idénticas, aproximadamente 90% idénticas, o aproximadamente 95% idénticas en una región específica. La identidad puede existir en una región que tiene al menos aproximadamente 75 a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, en una región que tiene aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o, cuando no se especifica, a través de la secuencia completa de una secuencia polipeptídica. Además, a modo de ejemplo solamente, dos o más secuencias de polinucleótidos son idénticas cuando los residuos de ácido nucleico son iguales, mientras que dos o más secuencias de polinucleótidos

son "sustancialmente idénticas" si los residuos de ácido nucleico son aproximadamente 60% idénticos, aproximadamente 65% idénticos, aproximadamente el 70% idénticos, aproximadamente el 75% idénticos, aproximadamente el 80% idénticos, aproximadamente el 85% idénticos, aproximadamente el 90% idénticos, o aproximadamente el 95% idénticos en una región específica. La identidad puede existir en una región que tiene al menos aproximadamente 75 a aproximadamente 100 ácidos nucleicos de longitud, en una región que tiene aproximadamente 50 ácidos nucleicos de longitud, o, cuando no se especifica, en toda la secuencia de una secuencia de polinucleótidos.

**[0076]** Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, a la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Se pueden usar parámetros de programa predeterminados o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencia luego calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

**[0077]** El término "inmunogenicidad", como se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta de anticuerpos a la administración de un fármaco terapéutico. La inmunogenicidad hacia polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos puede obtenerse usando ensayos cuantitativos y cualitativos para la detección de anticuerpos polipéptidos de aminoácidos no naturales en fluidos biológicos. Dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, Radioinmunoensayo (RIA), Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo luminiscente (LIA) e inmunoensayo fluorescente (FIA). El análisis de inmunogenicidad hacia polipéptidos de aminoácidos terapéuticos no naturales implica comparar la respuesta de anticuerpos tras la administración de polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos a la respuesta de anticuerpos tras la administración de polipéptidos de aminoácidos naturales terapéuticos.

**[0078]** El término "agente intercalante", también denominado "grupo intercalante", como se usa en el presente documento, se refiere a un producto químico que puede insertarse en el espacio intramolecular de una molécula o el espacio intermolecular entre moléculas. A modo de ejemplo, solo un agente o grupo intercalante puede ser una molécula que se inserta en las bases apiladas de la doble hélice de ADN.

**[0079]** El término "aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a separar y eliminar un componente de interés de componentes que no son de interés. Las sustancias aisladas pueden estar en un estado seco o semiseco, o en solución, que incluyen, pero no se limitan a, una solución acuosa. El componente aislado puede estar en un estado homogéneo o el componente aislado puede ser una parte de una composición farmacéutica que comprende vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. La pureza y la homogeneidad pueden determinarse usando técnicas de química analítica que incluyen, entre otras, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución. Además, cuando se aísla un componente de interés y es la especie predominante presente en una preparación, el componente se describe aquí como sustancialmente purificado. El término "purificado", como se usa en la presente memoria, puede referirse a un componente de interés que es al menos 85% puro, al menos 90% puro, al menos 95% puro, al menos 99% o más puro. Solo a modo de ejemplo, los ácidos nucleicos o proteínas están "aislados" cuando dichos ácidos nucleicos o proteínas están libres de al menos algunos de los componentes celulares con los que se asocian en estado natural, o de que el ácido nucleico o la proteína se ha concentrado a un nivel mayor que la concentración de su producción in vivo o *in vitro*. Además, a modo de ejemplo, se aísla un gen cuando se separa de marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican una proteína distinta del gen de interés.

**[0080]** El término "etiqueta", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que se incorpora en un compuesto y se detecta fácilmente, por lo que su distribución física se puede detectar y/o controlar.

**[0081]** El término "enlace", como se usa en el presente documento, se refiere a enlaces o restos químicos formados a partir de una reacción química entre el grupo funcional de un enlazador y otra molécula. Dichos enlaces pueden incluir, pero no se limitan a, enlaces covalentes y enlaces no covalentes, mientras que tales restos químicos pueden incluir, pero sin limitación, ésteres, carbonatos, iminas, ésteres de fosfato, hidrazonas, acetales, ortoésteres, enlaces peptídicos, y enlaces de oligonucleótidos. Los enlaces hidrolíticamente estables significan 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. Los enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significan que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, que incluyen, por ejemplo, sangre. Los enlaces enzimáticamente inestables o degradables significan que el enlace puede degradarse por una o más enzimas. A modo de ejemplo solamente, el PEG y los polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en la cadena principal del polímero o en el grupo enlazador entre la cadena principal del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula del polímero. Tales uniones degradables incluyen, pero no se limitan a enlaces éster formados por la reacción de ácidos carboxílicos PEG o ácidos carboxílicos PEG activados con grupos alcohol en un agente biológicamente activo, en donde tales grupos éster generalmente se hidrolizan bajo condiciones fisiológicas para liberar el agente biológicamente activo. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, pero sin limitación, enlaces de

carbonato; enlaces de imina resultantes 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 reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetales 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 grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosforamidito, que incluyen, pero no se limitan a, al final de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

**[0082]** Los términos "medio" o "medios", como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier medio de cultivo utilizado para cultivar y cosechar células y/o productos expresados y/o secretados por tales células. Tales "medio" o "medios" incluyen, pero no se limitan a, soportes en solución, sólidos, semisólidos o rígidos que pueden soportar o contener cualquier célula huésped, incluyendo, a modo de ejemplo, células huésped bacterianas, células huésped de levadura, células huésped de insecto, células hospedadoras de planta, células hospedadoras eucariotas, células hospedadoras de mamífero, células CHO, células hospedadoras procariotas, células hospedadoras de *E. coli* o *Pseudomonas*, y contenidos de células. Tal "medio" o "medios" incluyen, pero no se limitan al medio o a los medios en que se ha desarrollado la célula hospedadora en donde se ha secretado un polipéptido, que incluye un medio antes o después de una etapa de proliferación. Tal "medio" o "mediso" también incluye(n), pero no se limita(n) a, tampones o reactivos que contienen lisados de células huésped, a modo de ejemplo un polipéptido producido intracelularmente y las células hospedadoras se lisan o se rompen para liberar el polipéptido.

**[0083]** El término "metabolito", como se usa en el presente documento, se refiere a un derivado de un compuesto, a modo de ejemplo de polipéptido de aminoácido natural, un polipéptido de aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural modificado o un polipéptido de aminoácido modificado no natural, que se forma cuando el compuesto, a modo de polipéptido de aminoácido natural ejemplar, polipéptido de aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural modificado o polipéptido de aminoácido no natural modificado, se metaboliza. El término "metabolito farmacéuticamente activo" o "metabolito activo" se refiere a un derivado biológicamente activo de un compuesto, a modo de ejemplo polipéptido de aminoácido natural, un polipéptido de aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural modificado o un polipéptido de aminoácido no natural modificado, que se forma cuando tal compuesto, a modo de ejemplo un polipéptido de aminoácido natural, un polipéptido de aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural modificado o un polipéptido de aminoácido modificado no natural.

**[0084]** El término "metabolizado", como se usa en el presente documento, se refiere a la suma de los procesos mediante los cuales un organismo modifica una sustancia particular. Dichos procesos incluyen, pero no se limitan a, reacciones de hidrólisis y reacciones catalizadas por enzimas. Se puede obtener información adicional sobre metabolismo de *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª Edición, McGraw-Hill (1996). A modo de ejemplo solamente, los metabolitos de polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados pueden identificarse mediante la administración de los polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados a un huésped y análisis de muestras de tejido del huésped, o mediante la incubación de polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados con células hepáticas *in vitro* y análisis de los compuestos resultantes.

**[0085]** El término "quelante de metales", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que forma un complejo metálico con iones metálicos. A modo de ejemplo, tales moléculas pueden formar dos o más enlaces de coordinación con un ion metálico central y pueden formar estructuras de anillo.

**[0086]** El término "resto que contiene un metal", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que contiene un ion metálico, átomo o partícula. Dichos restos incluyen, pero sin limitación, cisplatino, iones de metales quelados (tales como níquel, hierro y platino) y nanopartículas metálicas (tales como níquel, hierro y platino).

**[0087]** El término "resto que incorpora un átomo pesado", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo que incorpora un ión de un átomo que es usualmente más pesado que el carbono. Dichos iones o átomos incluyen, pero no se limitan a, silicio, tungsteno, oro, plomo y uranio.

**[0088]** El término "modificado", como se usa en el presente documento, se refiere a la presencia de un cambio en un aminoácido natural, un aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural. Dichos cambios o modificaciones pueden obtenerse mediante modificaciones posteriores a la síntesis de aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales, o mediante la modificación cotraslacional o post-traslacional de aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales. La forma "modificada o no modificada" significa que el aminoácido natural, el aminoácido no natural, el polipéptido de aminoácido natural o el polipéptido de aminoácido no natural que se está discutiendo se modifican opcionalmente, es decir, el aminoácido natural, aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural o polipéptido de

aminoácido no natural en discusión puede modificarse o no modificarse.

**[0089]** Como se usa en el presente documento, el término "semivida en suero modulada" se refiere a cambios positivos o negativos en la vida media circulante de una molécula biológicamente activa modificada con respecto a su forma no modificada. A modo de ejemplo, las moléculas biológicamente activas modificadas incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales. A modo de ejemplo, la semivida en suero se mide tomando muestras de sangre en diversos puntos de tiempo después de la administración de la molécula biológicamente activa o molécula biológicamente activa modificada, y determinando la concentración de esa molécula en cada muestra. La correlación de la concentración sérica con el tiempo permite calcular la vida media en suero. A modo de ejemplo, la semivida en suero modulada puede ser un aumento en la vida media en suero, lo que puede permitir un régimen de dosificación mejorado o evitar efectos tóxicos. Tales aumentos en el suero pueden ser al menos aproximadamente dos veces, al menos aproximadamente tres veces, al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente diez veces. Un ejemplo no limitante de un método para evaluar aumentos en la vida media en suero se da en el ejemplo 33. Este método se puede usar para evaluar la vida media del suero de cualquier polipéptido.

**[0090]** El término "semivida terapéutica modulada", como se usa en el presente documento, se refiere a un cambio positivo o negativo en la vida media de la cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula modificada biológicamente activa, con respecto a su forma no modificada. A modo de ejemplo, las moléculas biológicamente activas modificadas incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales. A modo de ejemplo, la semivida terapéutica se mide midiendo las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de la molécula en diversos puntos temporales después de la administración. El aumento de la semivida terapéutica puede permitir un régimen de dosificación beneficioso particular, una dosis total beneficiosa particular, o evita un efecto no deseado. A modo de ejemplo, el aumento de la vida media terapéutica puede ser el resultado de una mayor potencia, un aumento o una disminución de la unión de la molécula modificada a su diana, un aumento o disminución de otro parámetro o mecanismo de acción de la molécula no modificada o un aumento o disminución de la descomposición de las moléculas por enzimas tales como, a modo de ejemplo solamente, proteasas. Un ejemplo no limitante de un método para evaluar aumentos en la vida media terapéutica se da en el ejemplo 33. Este método se puede usar para evaluar la vida media terapéutica de cualquier polipéptido.

**[0091]** El término "nanopartícula", como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula que tiene un tamaño de partícula entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 1 nm.

**[0092]** El término "casi estequiométrico", como se usa en el presente documento, se refiere a la relación de los moles de compuestos que participan en una reacción química que es de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 1,5.

**[0093]** Como se usa en el presente documento, el término "no eucariota" se refiere a organismos no eucariotas. A modo de ejemplo, un organismo no eucariota puede pertenecer al Eubacteria, (que incluye pero no se limita a, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, o *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*), dominio filogenético, o la Archaea, que incluye, pero no se limita a, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuryopyrum pernix*, o *Halobacterium* tales como *Haloferax volcanii* y especies de *Halobacterium* NRC-1, o dominio filogenético.

**[0094]** Un "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína. Otros términos que se pueden usar como sinónimos del término "aminoácido no natural" son "aminoácido no codificado de forma natural", "aminoácido no natural", "aminoácido que no se produce de forma natural", y diversamente versiones con guiones y sin guiones de los mismos. El término "aminoácido no natural" incluye, pero no se limita a, aminoácidos que se producen naturalmente por modificación de un aminoácido codificado de forma natural (que incluye, pero no se limita a, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína) pero que no son ellos mismos incorporados en una cadena polipeptídica creciente por el complejo de traducción. Los ejemplos de aminoácidos naturales que no están codificados de forma natural incluyen, pero no se limitan a, N-acetilglucosaminilo-L-serina, N-acetilglucosaminilo-L-treonina y O-fosfotirosina. Adicionalmente, el término "aminoácido no natural" incluye, pero no se limita a, aminoácidos que no se producen de forma natural y pueden obtenerse sintéticamente o pueden obtenerse por modificación de aminoácidos no naturales.

**[0095]** El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o ribonucleótidos y sus polímeros en forma monocatenaria o bicatenaria. A modo de ejemplo solamente, tales ácidos nucleicos y polímeros de ácido nucleico incluyen, pero sin limitación, (i) análogos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a un ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales; (ii) análogos de oligonucleótidos que incluyen, pero no se limitan a, PNA (ácido peptidonucleico), análogos de ADN usados en tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforoamidatos, y similares); (iii) variantes modificadas conservativamente de las mismas (que incluyen, pero sin limitarse a, sustituciones de codones degenerados) y secuencia y secuencias complementarias explícitamente

indicadas. A modo de ejemplo, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka y col., *J. Biol. Chem.* 260: 2605 - 2608 (1985) y Rossolini y col., *Mol. Cell. Probes* 8: 91 - 98 (1994)).

**[0096]** El término "agente oxidante", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o material que es capaz de eliminar un electrón de un compuesto que se está oxidando. A modo de ejemplo, los agentes oxidantes incluyen, pero no se limitan a, glutatión oxidado, cistina, cistamina, ditiotreitól oxidado, eritreitól oxidado y oxígeno. Una amplia variedad de agentes oxidantes son adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritas en este documento.

**[0097]** El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, se refiere a un material, que incluye, pero no se limita a, una sal, vehículo o diluyente, que no anula la actividad o propiedades biológicas del compuesto, y es relativamente no tóxico, es decir, el material se puede administrar a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuando de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

**[0098]** El término "etiqueta de fotoafinidad", como se usa en el presente documento, se refiere a un marcador con un grupo, que, tras la exposición a la luz, forma un enlace con una molécula para la cual el marcador tiene una afinidad. A modo de ejemplo solamente, tal enlace puede ser covalente o no covalente.

**[0099]** El término "resto fotocurado", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que, tras la iluminación a ciertas longitudes de onda, se une covalente o no covalentemente a otros iones o moléculas.

**[0100]** El término "grupo fotoescindible", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que se rompe tras la exposición a la luz.

**[0101]** El término "fotoreticulante", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que comprende dos o más grupos funcionales que, tras la exposición a la luz, son reactivos y forman un enlace covalente o no covalente con dos o más moléculas monoméricas o poliméricas.

**[0102]** El término "resto fotoisomerizable", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo en el que tras la iluminación con luz cambia de una forma isomérica a otra.

**[0103]** El término "polialquilenglicol", como se usa en el presente documento, se refiere a poliéter-poliolios poliméricos lineales o ramificados. Dichos polialquilenglicoles, que incluyen, aunque sin limitación, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol y derivados de los mismos. Otras realizaciones a modo de ejemplo se enumeran, por ejemplo, en catálogos de proveedores comerciales, tales como el catálogo de Shearwater Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001). A modo de ejemplo solamente, tales poliéter poliolios poliméricos tienen pesos moleculares medios entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa. A modo de ejemplo, tales poliolios de poliéter poliméricos incluyen, pero sin limitación, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente 100.000 Da, aproximadamente 95.000 Da, aproximadamente 90.000 Da, aproximadamente 85.000 Da, aproximadamente 80.000 Da, aproximadamente 75.000 Da, aproximadamente 70.000 Da, aproximadamente 65.000 Da, aproximadamente 60.000 Da, aproximadamente 55.000 Da, aproximadamente 50.000 Da, aproximadamente 45.000 Da, aproximadamente 40.000 Da, aproximadamente 35.000 Da, aproximadamente 30.000 Da, aproximadamente 25.000 Da, aproximadamente 20.000 Da, aproximadamente 15.000 Da, aproximadamente 10.000 Da, aproximadamente 9.000 Da, aproximadamente 8.000 Da, aproximadamente 7.000 Da, aproximadamente 6.000 Da, aproximadamente 5.000 Da, aproximadamente 4.000 Da, aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 2.000 Da, aproximadamente 1.000 Da, aproximadamente 900 Da, aproximadamente 800 Da, aproximadamente 700 Da, aproximadamente 600 Da, alrededor de 500 Da, 400 Da, alrededor de 300 Da, alrededor de 200 Da, y alrededor de 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 2.000 a aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado. El peso molecular del PEG de cadena ramificada puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, que incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente 100.000 Da, aproximadamente 95.000 Da, aproximadamente 90.000 Da, aproximadamente 85.000 Da, aproximadamente 80.000 Da, aproximadamente 75.000 Da, aproximadamente 70.000 Da, aproximadamente 65.000 Da, aproximadamente 60.000 Da, aproximadamente 55.000 Da, aproximadamente 50.000 Da, aproximadamente 45.000 Da, aproximadamente 40.000 Da, aproximadamente 35.000 Da, aproximadamente 30.000 Da, aproximadamente 25.000 Da, aproximadamente 20.000 Da, aproximadamente 15.000

Da, aproximadamente 10.000 Da, aproximadamente 9.000 Da, aproximadamente 8.000 Da, aproximadamente 7.000 Da, aproximadamente 6.000 Da, aproximadamente 5.000 Da, aproximadamente 4.000 Da, aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 2.000 Da, y aproximadamente 1.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da. En otras realizaciones, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 50.000 Da.

**[0104]** El término "polímero", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula compuesta de subunidades repetidas. Dichas moléculas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos o polisacáridos o polialquilenglicoles.

**[0105]** Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido se aplica igualmente a una descripción de un péptido y a una descripción de una proteína, y viceversa. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos naturales, así como a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son aminoácidos no naturales. Adicionalmente, tales "polipéptidos", "péptidos" y "proteínas" incluyen cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en donde los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

**[0106]** El término "modificado postraduccionalmente" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que se produce después de que dicho aminoácido se haya incorporado por traducción a una cadena polipeptídica. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificaciones *in vivo* co-traduccionales, modificaciones *in vitro* de traducción simultánea (tales como en un sistema de traducción libre de células), modificaciones *in vivo* postraduccionales y modificaciones *in vitro* postraduccionales.

**[0107]** Los términos "profármaco" o "profármaco farmacéuticamente aceptable", como se usan en el presente documento, se refieren a un agente que se convierte en el fármaco original *in vivo* o *in vitro*, en donde no anula la actividad o propiedades biológicas del fármaco, y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido. Los profármacos son generalmente precursores de fármacos que, después de la administración a un sujeto y la posterior absorción, se convierten en una especie activa o más activa a través de algún proceso, como la conversión por una ruta metabólica. Algunos profármacos tienen un grupo químico presente en el profármaco que lo hace menos activo y/o confiere solubilidad u otra propiedad al fármaco. Una vez que el grupo químico se ha escindido y/o modificado del profármaco, se genera el fármaco activo. Los profármacos se convierten en un fármaco activo en el cuerpo a través de reacciones enzimáticas o no enzimáticas. Los profármacos pueden proporcionar propiedades fisicoquímicas mejoradas tales como una mejor solubilidad, características de administración mejoradas, tales como dirigirse específicamente a una célula, tejido, órgano o ligando particular, y un valor terapéutico mejorado del fármaco. Los beneficios de dichos profármacos incluyen, pero no se limitan a, (i) facilidad de administración en comparación con el fármaco original; (ii) el profármaco puede estar biodisponible por administración oral mientras que el padre no lo está; y (iii) el profármaco también puede tener una solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas en comparación con el fármaco original. Un profármaco incluye un derivado farmacológicamente inactivo o de actividad reducida de un fármaco activo. Los profármacos se pueden diseñar para modular la cantidad de un fármaco o molécula biológicamente activa que alcanza un sitio de acción deseado mediante la manipulación de las propiedades de un fármaco, como las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas o farmacocinéticas. Un ejemplo, sin limitación, de un profármaco sería un polipéptido de aminoácido no natural que se administra como un éster (el "profármaco") para facilitar la transmisión a través de una membrana celular donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad pero que luego se hidroliza metabólicamente al ácido carboxílico, la entidad activa, una vez dentro de la célula donde la solubilidad en agua es beneficiosa. Los profármacos se pueden diseñar como derivados de fármacos reversibles, para uso como modificadores para mejorar el transporte de fármacos a tejidos específicos del sitio.

**[0108]** El término "cantidad profilácticamente efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácido no natural o al menos un polipéptido de aminoácido no natural modificado aplicado profilácticamente a un paciente que aliviará hasta cierto punto uno o más de los síntomas de una enfermedad, afección o trastorno que se está tratando. En tales aplicaciones profilácticas, tales cantidades pueden depender del estado de salud, peso y similares del paciente. Se considera que un experto en la técnica puede determinar tales cantidades profilácticamente efectivas mediante experimentación rutinaria, que incluye, pero no se limita a, un ensayo clínico de intensificación de la dosis.

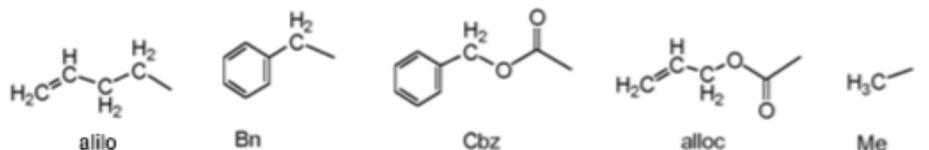
**[0109]** El término "protegido", como se usa en este documento, se refiere a la presencia de un "grupo protector" o resto que evita la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará según el tipo de grupo químicamente reactivo que se está protegiendo. A modo de ejemplo solamente, (i) si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector puede

seleccionarse entre terc-butiloxycarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc); (ii) si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfuro; y (iii) si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo tal como metilo, etilo o terc-butilo.

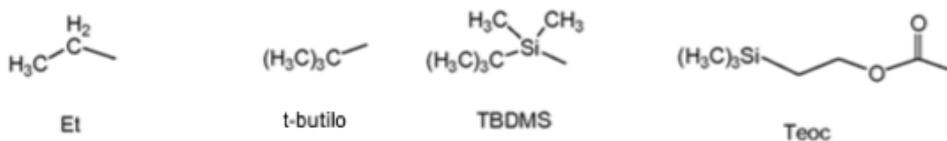
5

**[0110]** A modo de ejemplo solamente, los grupos de bloqueo/protección se pueden seleccionar de:

10

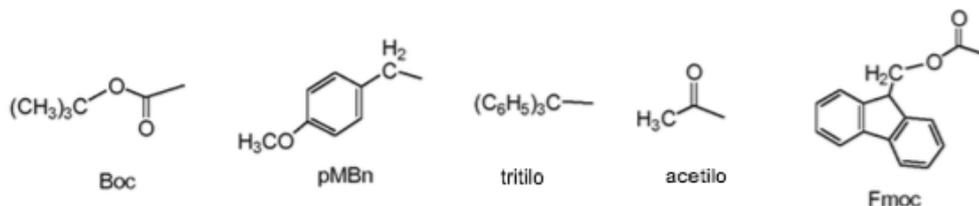


15



20

25



30

**[0111]** Además, los grupos protectores incluyen, entre otros, grupos fotolábiles como Nvoc y MeNvoc y otros grupos protectores conocidos en la técnica. Otros grupos protectores se describen en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª edición, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1999.

35

**[0112]** El término "resto radiactivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo cuyos núcleos emiten espontáneamente radiación nuclear, tal como partículas alfa, beta o gamma; donde las partículas alfa son núcleos de helio, las partículas beta son electrones y las partículas gamma son fotones de alta energía.

40

**[0113]** El término "compuesto reactivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que en condiciones apropiadas es reactivo frente a otro átomo, molécula o compuesto.

45

**[0114]** El término "célula hospedadora recombinante", también denominada "célula hospedadora", se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, en donde los métodos usados para insertar el polinucleótido exógeno en una célula incluyen, pero no están limitados a, toma directa, transducción, apareamiento f, u otros métodos conocidos en la técnica para crear células hospedadoras recombinantes. A modo de ejemplo solamente, dicho polinucleótido exógeno puede ser un vector no integrado, que incluye pero no se limita a un plásmido, o puede integrarse en el genoma del huésped.

50

**[0115]** El término "agente activo redox", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que oxida o reduce otra molécula, con lo que el agente activo redox se reduce u oxida. Los ejemplos de agente activo redox incluyen, pero sin limitación, ferroceno, quinonas, complejos  $\text{Ru}^{2+/3+}$ , complejos  $\text{CO}^{2+/3+}$  y complejos  $\text{Os}^{2+/3+}$ .

55

**[0116]** El término "agente reductor", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o material que es capaz de añadir un electrón a un compuesto que se está reduciendo. A modo de ejemplo, los agentes reductores incluyen, pero sin limitación, ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol, ditioeritrol, cisteína, cisteamina (2-aminoetanotiol) y glutatión reducido. Dichos agentes reductores se pueden usar, solo a modo de ejemplo, para mantener grupos sulfhidrilo en el estado reducido y para reducir los enlaces disulfuro intra o intermoleculares.

60

**[0117]** "Replegamiento", como se usa en este documento, describe cualquier proceso, reacción o método que transforma un estado incorrectamente plegado o desplegado a una conformación nativa o plegada correctamente. A modo de ejemplo solamente, el replegamiento transforma los polipéptidos que contienen enlaces disulfuro desde un estado incorrectamente plegado o desplegado a una conformación nativa o plegada apropiadamente con respecto a los enlaces disulfuro. Dichos polipéptidos que contienen enlaces disulfuro pueden ser polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales.

65

**[0118]** El término "resina", como se usa en el presente documento, se refiere a perlas de polímero insoluble de alto peso molecular. A modo de ejemplo solamente, tales perlas pueden usarse como soportes para la síntesis de péptidos en fase sólida, o sitios para la unión de moléculas antes de la purificación.

5 **[0119]** El término "sacárido", como se usa en el presente documento, se refiere a una serie de carbohidratos que incluyen, pero no se limitan a, azúcares, monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

10 **[0120]** El término "seguridad" o "perfil de seguridad", como se usa en el presente documento, se refiere a los efectos secundarios que podrían estar relacionados con la administración de un fármaco con relación al número de veces que se ha administrado el fármaco. A modo de ejemplo, se dice que un fármaco que se ha administrado muchas veces y que ha producido efectos secundarios leves o nulos tiene un excelente perfil de seguridad. Un ejemplo no limitante de un método para evaluar el perfil de seguridad se da en el ejemplo 26. Este método se puede usar para evaluar el perfil de seguridad de cualquier polipéptido.

15 **[0121]** La frase "se hibrida selectivamente a" o "se hibrida específicamente con", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión, dúplex o hibridación de una molécula a una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja que incluye, pero no se limita a, ADN o ARN celular o de biblioteca total.

20 **[0122]** El término "marcador de espín", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas que contienen un átomo o un grupo de átomos que exhiben un espín de electrones impar (es decir, un grupo paramagnético estable) que puede detectarse por espectroscopia de resonancia de spin electrónico y puede unido a otra molécula. Tales moléculas de etiqueta de espín incluyen, pero no se limitan a, radicales nitrílicos y nitróxidos, y pueden ser etiquetas de espín individuales o marcadores de doble espín.

25 **[0123]** El término "estequiométrico", como se usa en el presente documento, se refiere a la relación de los moles de compuestos que participan en una reacción química que es de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,1.

30 **[0124]** El término "de tipo estequiométrico", como se usa en el presente documento, se refiere a una reacción química que se convierte en estequiométrica o casi estequiométrica tras cambios en las condiciones de reacción o en presencia de aditivos. Tales cambios en las condiciones de reacción incluyen, pero no se limitan a, un aumento de la temperatura o un cambio en el pH. Tales aditivos incluyen, pero no se limitan a, acelerantes.

35 **[0125]** La frase "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a la hibridación de secuencias de ADN, ARN, PNA u otros imitadores de ácidos nucleicos, o combinaciones de los mismos, en condiciones de baja fuerza iónica y alta temperatura. A modo de ejemplo, en condiciones rigurosas, una sonda se hibridará con su subsecuencia diana en una mezcla compleja de ácido nucleico (que incluye, pero no se limita a, ADN o ARN celular o de biblioteca total) pero no se hibrida con otras secuencias en la mezcla compleja. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. A modo de ejemplo, las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero no se limitan a, (i) aproximadamente 5-10°C más bajo que el punto de fusión térmico (T<sub>m</sub>) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos; (ii) la concentración de sal es de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 1,0 M a aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (que incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (que incluyen, pero no se limitan a, más de 50 nucleótidos); (iii) la adición de agentes desestabilizadores que incluyen, pero no se limitan a, formamida, (iv) 50% de formamida, 5X SSC y 1% de SDS, incubando a 42°C, o 5X SSC, aproximadamente 1% de SDS, incubándose a 65°C, con lavado en 0,2X SSC, y aproximadamente 0,1% SDS a 65°C durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 120 minutos. A modo de ejemplo solamente, la detección de hibridación selectiva o específica incluye, pero no se limita a, una señal positiva al menos dos veces de fondo. Una amplia guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993).

50 **[0126]** El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un animal que es el objeto de tratamiento, observación o experimento. A modo de ejemplo solamente, un sujeto puede ser, pero no se limita a, un mamífero que incluye, pero no se limita a, un ser humano.

55 **[0127]** El término "sustancialmente purificado", como se usa en el presente documento, se refiere a un componente de interés que puede estar sustancialmente o esencialmente libre de otros componentes que normalmente acompañan o interactúan con el componente de interés antes de la purificación. A modo de ejemplo solamente, un componente de interés puede estar "sustancialmente purificado" cuando la preparación del componente de interés contiene menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, o menos de aproximadamente 1% (en peso seco) de componentes contaminantes. Por lo tanto, un componente de interés "sustancialmente purificado" puede tener un nivel de pureza de aproximadamente 70%, aproximadamente 75%,

aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más. A modo de ejemplo solamente, un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural se puede purificar a partir de una célula nativa, o una célula huésped en el caso de polipéptidos de aminoácidos naturales producidos de forma recombinante o polipéptidos de aminoácidos no naturales. A modo de ejemplo, una preparación de un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural puede "purificarse sustancialmente" cuando la preparación contiene menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, o menos de aproximadamente 1% (en peso seco) de material contaminante. A modo de ejemplo, cuando un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural se produce de forma recombinante por células huésped, el polipéptido de aminoácido natural o polipéptido de aminoácido no natural puede estar presente en aproximadamente 30%, aproximadamente 25%, aproximadamente 20%, aproximadamente 15%, aproximadamente 10%, aproximadamente 5%, aproximadamente 4%, aproximadamente 3%, aproximadamente 2%, o aproximadamente 1% o menos del peso seco de las células. A modo de ejemplo, cuando un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural se produce de forma recombinante por células huésped, el polipéptido de aminoácido natural o polipéptido de aminoácido no natural puede estar presente en el medio de cultivo a aproximadamente 5 g/L, aproximadamente 4 g/L, aproximadamente 3 g/L, aproximadamente 2 g/L, aproximadamente 1 g/L, aproximadamente 750 mg/L, aproximadamente 500 mg/L, aproximadamente 250 mg/L, aproximadamente 100 mg/L, aproximadamente 50 mg/L, aproximadamente 10 mg/L, o aproximadamente 1 mg/L o menos del peso seco de las células. A modo de ejemplo, los polipéptidos de aminoácidos naturales "sustancialmente purificados" o polipéptidos de aminoácidos no naturales pueden tener un nivel de pureza de aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 65%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 75%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 99% o más, según lo determinan los métodos apropiados, incluidos, entre otros, Análisis de SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar.

**[0128]** El término "sustituyentes" también denominados "sustituyentes que no interfieren" se refiere a grupos que pueden usarse para reemplazar otro grupo en una molécula. Tales grupos incluyen, pero no se limitan a, halo, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alqueno, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquino, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alcoxi, C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub> aralquilo, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> cicloalquilo, cicloalqueno C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>, fenilo, fenilo sustituido, toluolilo, xilenilo, bifenilo, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alcoxiarilo, C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub> ariloxiarilo, C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub> ariloxialquilo, C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> oxiarilo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilsulfino, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilsulfonilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo) en donde m es de 1 a 8, arilo, arilo sustituido, alcoxi sustituido, fluoroalquilo, radical heterocíclico, radical heterocíclico sustituido, nitroalquilo, -NO<sub>2</sub>, -CN, -NRC(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo), -C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo), C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquiloalquilo, -C(O)O-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo), -OH, -SO<sub>2</sub>, =S, -COOH, -NR<sub>2</sub>, carbonilo, -C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo) -CF<sub>3</sub>, -C(O)-CF<sub>3</sub>, -C(O)NR<sub>2</sub>, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> arilo)-S-(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> arilo), -C(O)-(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> arilo), -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo) en donde cada m es de 1 a 8, -C(O)NR<sub>2</sub>, -C(S)NR<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, -NRC(O)NR<sub>2</sub>, -NRC(S)NR<sub>2</sub>, sales de los mismos, y similares. Cada grupo R en la lista anterior incluye, pero no se limita a, H, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido o alcarilo. Cuando los grupos de sustituyentes se especifican por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda; por ejemplo, -CH<sub>2</sub>O- es equivalente a -OCH<sub>2</sub>-.

**[0129]** A modo de ejemplo solamente, los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (que incluyen los grupos denominados alqueno, alqueno, heteroalqueno, heteroalqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno y heterocicloalqueno) incluyen, pero no están limitados a: -OR, =O, =NR, =N-OR, -NR<sub>2</sub>, -SR, -halógeno, -SiR<sub>3</sub>, -OC(O)R, -C(O)R, -CO<sub>2</sub>R, -CONR<sub>2</sub>, -OC(O)NR<sub>2</sub>, -NRC(O)R, -NRC(O)NR<sub>2</sub>, -NR(O)<sub>2</sub>R, -NR-C(NR<sub>2</sub>)=NR, -S(O)R, -S(O)<sub>2</sub>R, -S(O)<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, -NRSO<sub>2</sub>R, -CN y -NO<sub>2</sub>. Cada grupo R en la lista anterior incluye, pero no se limita a, hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, que incluye pero no se limita a, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi o grupos tioalcoxi, o grupos aralquilo. Cuando dos grupos R están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR<sub>2</sub> pretende incluir, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo.

**[0130]** A modo de ejemplo, los sustituyentes para grupos arilo y heteroarilo incluyen, pero no están limitados a, -OR, =O, =NR, =N-OR, -NR<sub>2</sub>, -SR, -halógeno, -SiR<sub>3</sub>, -OC(O)R, -C(O)R, -CO<sub>2</sub>R, -CONR<sub>2</sub>, -OC(O)NR<sub>2</sub>, -NRC(O)R, -NRC(O)NR<sub>2</sub>, -NR(O)<sub>2</sub>R, -NR-C(NR<sub>2</sub>)=NR, -S(O)R, -S(O)<sub>2</sub>R, -S(O)<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, -NRSO<sub>2</sub>R, -CN, -NO<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -CH(Ph)<sub>2</sub>, fluoro(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alcoxi y fluoro(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquilo, en un número que varía desde cero hasta el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde cada grupo R en la lista anterior incluye, pero no se limita a, hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo y heteroarilo.

**[0131]** El término "cantidad terapéuticamente efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácido no natural y/o al menos un polipéptido de aminoácido no natural modificado administrado a un paciente que ya padece una enfermedad, afección o trastorno, suficiente para curar o, al menos, detener parcialmente, o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que se está tratando. La efectividad de tales composiciones

depende de condiciones que incluyen, pero no se limitan a, la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o condición, terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los medicamentos, y el juicio del médico tratante. A modo de ejemplo solamente, las cantidades terapéuticamente efectivas pueden determinarse mediante experimentación rutinaria, que incluye, pero no se limita a, un ensayo clínico de intensificación de la dosis.

**[0132]** El término "tioalcoxi", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos alquilo que contienen azufre unidos a moléculas a través de un átomo de oxígeno.

**[0133]** El término "punto de fusión térmica" o  $T_m$  es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidas) a la cual el 50% de las sondas complementarias a un objetivo se hibridan con la secuencia diana en equilibrio.

**[0134]** El término "resto tóxico" o "grupo tóxico" como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que puede causar daño, alteraciones o muerte. Los restos tóxicos incluyen, pero no se limitan a, auristatina, agente aglutinante del surco minoritario del ADN, agente alquilante del surco minoritario del ADN, enediina, lexitropsina, duocarmicina, taxano, puromicina, dolastatina, maitansinoide, alcaloide de la vinca, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecan, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolinodorortrubina, dolastatina-10, echinomicina, combretastatina, chaliceamicina, maitansina, DM-1, netropsina, podofilotoxina (p.ej., etopósido, tenipósido, etc.), bacatina y sus derivados, agentes anti tubulina, criptofisina, combretastatina, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, epotolidona A, epotilona B, nocodazol, colchicines, colcimida, estramustina, cemadotina, discodermolida, maitansina, eleutrobina, mecloretamina, ciclofosfamida, melfalano, carmustina, lomustina, semustina, streptozocina, clorozotocina, mostaza de uracilo, clormetina, ifosfamida, clorambucilo, pipobromano, trietilenmelamina, trietilenotiofosfoamina, busulfán, dacarbazina y temozolomida, yorarabina, citosina arabinósido, fluorouracilo, floxuridina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, pentostatina, 5-fluorouracilo, metotrexato, 10-propargilo-5,8-dideazalato, ácido 5,8-dideazatetrahidrofólico, leucovorina, fosfato de fludarabina, pentostatina, gemcitabina, Ara-C, paclitaxel, docetaxel, desoxicofurformimina, mitomicina-C, L-asparaginasa, azatioprina, brequinar, antibióticos (p. ej., antraciclina, gentamicina, cefalotina, vancomicina, telavancina, daptomicina, azitromicina, eritromicina, rocitromicina, furazolidona, amoxicilina, ampicilina, carbenicilina, flucloxacilina, meticilina, penicilina, ciprofloxacina, moxifloxacina, ofloxacina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, estreptomomicina, rifabutina, etambutol, rifaximina, etc.), medicamentos antivirales (p. ej., abacavir, aciclovir, amplígeno, cidofovir, delavirdina, didanosina, efavirenz, entecavir, fosfonet, ganciclovir, ibacitabina, inmunovir, idoxuridina, inosina, lopinavir, metisazona, nexavir, nevirapina, oseltamivir, penciclovir, estavudina, trifluridina, truvada, valaciclovir, zanamivir, etc.), hidrocioruro de daunorrubicina, daunomicina, rubidomicina, cerubidina, idarrubicina, doxorubicina, epirubicina y derivados de morfolino. besciclopéptidos de fenoxixona (p. ej., dactinomicina), glucopéptidos básicos (p. ej., bleomicina), glucósidos de antraquinona (p. ej., plicamicina, mitramicina), antracenedionas (p. ej., mitoxantrona), indolecionas de azirinopirrol (p. ej., mitomicina), inmunosupresores macrocíclicos (p. ej., ciclosporina, FK-506, tacrolimus, prograf, rapamicina, etc.), navelbene, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida, droloxafina, alocolchicina, halicondrina B, colchicina, derivados de colchicina, maitansina, rizoxina, paclitaxel, paclitaxel derivados, docetaxel, tiocolchicina, tritil cisterina, sulfato de vinblastina, vincristina sulfato, cisplatino, carboplatino, hidroxiourea, N-metilhidrazina, epidofilotoxina, procarbazona, mitoxantrona, leucovorina, y tegafur. Los "taxanos" incluyen paclitaxel, así como cualquier derivado de taxano activo o profármaco.

**[0135]** Los términos "tratar", "tratado" o "tratamiento", como se usan en el presente documento, incluyen aliviar, disminuir o mejorar una enfermedad o afección, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad o condición, por ejemplo, detener el desarrollo de la enfermedad o condición, aliviar la enfermedad o condición, causar la regresión de la enfermedad o condición, aliviar una condición causada por la enfermedad o condición, o detener los síntomas de la enfermedad o condición. Los términos "tratar", "tratado" o "tratamiento" incluyen, entre otros, tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

**[0136]** Como se usa en el presente documento, el término "polímero soluble en agua" se refiere a cualquier polímero que sea soluble en disolventes acuosos. Dichos polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, polietilenglicol propionaldehído, derivados mono  $C_{1-10}$  alcoxi o ariloxi de los mismos (descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.252.714), monometoxi-polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliamina ácidos, diviniléter, anhídrido maleico, N-(2-hidroxiopropilo)-metacrilamida, dextrano, derivados del dextrano incluyendo sulfato de dextrano, polipropilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioli polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glicanos, celulosa y derivados de celulosa, que incluyen pero no se limitan a metilcelulosa y carboximetilcelulosa, albúmina de suero, almidón y derivados de almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y sus derivados, copolímeros de polialquilenglicoles y sus derivados, poliviniléteres de etilo y alfa-beta-poli[(2-hidroxi-etilo)-DL-aspartamida, y similares, o mezclas de los mismos. A modo de ejemplo solamente, el acoplamiento de tales polímeros solubles en agua a polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos no naturales pueden dar como resultado cambios que incluyen, pero no se limitan a, solubilidad en agua aumentada, semivida en suero aumentada o modulada, medio terapéutico aumentado o modulado -vida relativa a la forma no modificada, biodisponibilidad aumentada, actividad biológica modulada, tiempo de circulación prolongado, inmunogenicidad modulada, características de asociación física moduladas que incluyen, pero no se limitan a, agregación y formación de multímeros, unión alterada del receptor, unión alterada a

uno o más compañeros de unión y alteración de la dimerización o multimerización del receptor. Además, tales polímeros solubles en agua pueden tener o no su propia actividad biológica.

5 **[0137]** A menos que se indique lo contrario, se emplean métodos convencionales de espectroscopía de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de los conocimientos de la técnica.

10 **[0138]** Los compuestos, (que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos modificados de aminoácidos no naturales y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) presentados en la presente incluyen compuestos marcados isotópicamente., que son idénticos a los enumerados en las diversas fórmulas y estructuras presentadas en este documento, pero por el hecho de que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número de masa diferente de la masa atómica o el número de masa que se encuentra generalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los presentes compuestos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ , respectivamente. Ciertos compuestos marcados isotópicamente descritos en este documento, por ejemplo aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , son útiles en ensayos de distribución de tejido de sustrato y/o fármaco. Además, la sustitución con isótopos tales como deuterio, es decir,  $^2\text{H}$ , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo una vida media mayor in vivo o requisitos de dosificación reducidos.

20 **[0139]** Algunos de los compuestos de la presente invención (que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) tienen átomos de carbono asimétricos y por lo tanto puede existir como enantiómeros o diastereómeros. Las mezclas diastereoméricas se pueden separar en sus diastereómeros individuales sobre la base de sus diferencias físicas y químicas mediante métodos conocidos, por ejemplo, mediante cromatografía y/o cristalización fraccionada. Los enantiómeros se pueden separar convirtiendo la mezcla enantiomérica en una mezcla diastereomérica por reacción con un compuesto ópticamente activo apropiado (por ejemplo, alcohol), separando los diastereómeros y convirtiendo (por ejemplo, hidrolizando) los diastereómeros individuales en los enantiómeros puros correspondientes. Todos estos isómeros, incluyendo diastereómeros, enantiómeros y mezclas de los mismos, se consideran parte de las composiciones descritas en este documento.

25 **[0140]** En realizaciones adicionales, los compuestos descritos en este documento (que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) son utilizados en forma de profármacos. En realizaciones adicionales, los compuestos descritos en la presente memoria ((que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) se metabolizan a partir de administración a un organismo que necesita producir un metabolito que luego se usa para producir un efecto deseado, que incluye un efecto terapéutico deseado. En realizaciones adicionales, son metabolitos activos de aminoácidos no naturales y polipéptidos aminoácidos no naturales "modificados o no modificados".

35 **[0141]** Los métodos y formulaciones descritas en este documento incluyen el uso de N-óxidos, formas cristalinas (también conocidas como polimorfos), o sales farmacéuticamente aceptables de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados. En ciertas realizaciones, los aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados pueden existir como tautómeros. Todos los tautómeros están incluidos dentro del alcance de los aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados que se presentan en este documento. Además, los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados descritos en la presente pueden existir en formas no solvatadas y solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares. Las formas solvatadas de los aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados presentados en este documento también se consideran divulgados en el presente documento.

45 **[0142]** Algunos de los compuestos de la presente invención (que incluyen, aunque sin limitación, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) pueden existir en varias formas de compuestos tautoméricos. Todas estas formas tautoméricas se consideran parte de las composiciones descritas en este documento. También, por ejemplo, se consideran todas las formas de enol-ceto de cualquier compuesto (incluidas, pero sin limitación, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) en este documento como parte de las composiciones descritas en este documento.

60 **[0143]** Algunos de los compuestos de la presente invención (que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y

reactivos para producir cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente) son ácidos y pueden formar una sal con un catión farmacéuticamente aceptable. Algunos de los compuestos de la presente invención (que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) pueden ser básicos y, por consiguiente, pueden formar una sal con un anión farmacéuticamente aceptable. Todas estas sales, incluidas las di-sales, están dentro del alcance de las composiciones descritas en este documento y pueden prepararse por métodos convencionales. Por ejemplo, las sales pueden prepararse poniendo en contacto las entidades ácidas y básicas, en un medio acuoso, no acuoso o parcialmente acuoso. Las sales se recuperan usando al menos una de las siguientes técnicas: filtración, precipitación con un no disolvente seguido de filtración, evaporación del disolvente o, en el caso de soluciones acuosas, liofilización.

**[0144]** Se pueden formar sales farmacéuticamente aceptables de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en la presente invención cuando un protón ácido presente en los polipéptidos de aminoácidos no naturales originales se reemplaza por un ion metálico, a modo de ejemplo un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion de aluminio; o coordina con una base orgánica. Además, las formas de sal de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos se pueden preparar usando sales de los materiales de partida o compuestos intermedios. Los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en la presente pueden prepararse como una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable (que es un tipo de una sal farmacéuticamente aceptable) haciendo reaccionar la forma de base libre de polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en la presente memoria con un producto farmacéuticamente aceptable ácido inorgánico u orgánico aceptable. Alternativamente, los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en este documento pueden prepararse como sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables (que son un tipo de una sal farmacéuticamente aceptable) haciendo reaccionar la forma de ácido libre de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en la presente memoria con una base inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable.

**[0145]** El tipo de sales farmacéuticamente aceptables incluye, pero no se limita a: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formado con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoilo)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-metilbencilo[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 4,4'-metilbis-(3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxianoftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original se reemplaza por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion de aluminio; o coordina con una base orgánica. Las bases orgánicas aceptables incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares. Las bases inorgánicas aceptables incluyen hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio y similares.

**[0146]** Los contraiones correspondientes de las sales farmacéuticamente aceptables del polipéptido de aminoácido no natural se pueden analizar e identificar usando diversos métodos que incluyen, entre otros, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía iónica, electroforesis capilar, plasma acoplado inductivamente, espectroscopia de absorción atómica, espectrometría de masas o cualquier combinación de los mismos. Además, la actividad terapéutica de tales sales farmacéuticamente aceptables de polipéptidos de aminoácidos no naturales puede ensayarse usando las técnicas y métodos descritos en los ejemplos 87-91.

**[0147]** Debe entenderse que una referencia a una sal incluye las formas de adición de disolvente o formas cristalinas de las mismas, particularmente solvatos o polimorfos. Los solvatos contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de un disolvente, y a menudo se forman durante el proceso de cristalización con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares. Los hidratos se forman cuando el solvente es agua, o se forman alcoholatos cuando el solvente es alcohol. Los polimorfos incluyen los diferentes arreglos de empaquetamiento de cristales de la misma composición elemental de un compuesto. Los polimorfos generalmente tienen diferentes patrones de difracción de rayos X, espectros infrarrojos, puntos de fusión, densidad, dureza, forma cristalina, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. Diversos factores tales como el disolvente de recristalización, la velocidad de cristalización y la temperatura de almacenamiento pueden provocar que domine una forma de cristal único.

**[0148]** El cribado y la caracterización de polimorfos y/o solvatos de sales farmacéuticamente aceptables de polipéptidos de aminoácidos no naturales se puede realizar usando una variedad de técnicas que incluyen, pero no se limitan a, análisis térmico, difracción de rayos X, espectroscopia, sorción de vapor, y microscopia. Los métodos de análisis térmico abordan la degradación termoquímica o los procesos termo-físicos que incluyen, pero no se limitan a, transiciones polimórficas, y tales métodos se utilizan para analizar las relaciones entre formas polimórficas, determinar la pérdida de peso, encontrar la temperatura de transición vítrea o estudios de compatibilidad con excipientes. Tales métodos incluyen, entre otros, calorimetría de barrido diferencial (DSC), calorimetría de barrido

diferencial modulado (MDCS), análisis termogravimétrico (TGA) y análisis termogramétrico e infrarrojo (TG/IR). Los métodos de difracción de rayos X incluyen, entre otros, difractómetros de un solo cristal y polvo y fuentes de sincrotrón. Las diversas técnicas espectroscópicas utilizadas incluyen, pero no se limitan a, Raman, FTIR, UVIS y RMN (estado líquido y sólido). Las diversas técnicas de microscopía incluyen, entre otras, microscopía de luz polarizada, microscopía electrónica de barrido (SEM) con análisis de energía por rayos X (EDX), microscopía electrónica de barrido ambiental con EDX (en atmósfera de gas o vapor de agua), microscopía IR, y microscopía Raman.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0149]** Las nuevas características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

La Figura 1 presenta una ilustración gráfica de la unión de Her-Tox al receptor Her2.

La Figura 2 presenta una ilustración gráfica de la expresión de variantes de anti-Her2 determinada por análisis de ELISA.

La Figura 3 presenta una ilustración gráfica de la expresión de variantes de anti-Her2 determinada por análisis de ELISA.

La Figura 4 presenta una ilustración gráfica del ensayo de proliferación celular con línea celular de cáncer de mama HCC 1954 y derivados de enlazador de dolastatina.

La Figura 5 presenta una ilustración gráfica del análisis del ensayo de proliferación celular con línea celular de cáncer de mama HCC 1954 y conjugados de trastuzumab-tox.

La Figura 6 presenta una ilustración gráfica del análisis del ensayo de proliferación celular con la línea celular de cáncer de ovario SKOV-3 y los derivados del enlazador de dolastatina.

La Figura 7 presenta una ilustración gráfica del análisis del ensayo de proliferación celular con línea celular de cáncer de ovario SKOV-3 y conjugados de trastuzumab-tox.

La Figura 8 presenta una ilustración gráfica del análisis del ensayo de proliferación celular con línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468 y derivados de enlazador de dolastatina.

La Figura 9 presenta una ilustración gráfica del análisis del ensayo de proliferación celular con línea de cáncer de mama MDA-MB-468 y conjugados de trastuzumab-tox.

La Figura 10 presenta una ilustración gráfica de la medición del volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) después de una única dosis IC (3,3 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg) de derivados de dolastatina unidos a trastuzumab.

La Figura 11 presenta los formatos de ensayo utilizados para medir la concentración de derivados de dolastatina enlazados con trastuzumab en suero de rata SD.

La Figura 12 presenta ilustraciones gráficas de las concentraciones séricas (ng/mL) de derivados de dolastatina unidas a trastuzumab después de inyecciones intravenosas únicas.

La Figura 13 presenta una ilustración gráfica de las concentraciones séricas (ng/mL) de derivados de dolastatina unidas a trastuzumab después de inyecciones intravenosas únicas. Este ensayo detecta la unión de anticuerpos al receptor ErbB2.

La Figura 14 presenta una ilustración gráfica de las concentraciones séricas (ng/mL) de derivados de dolastatina unidas a trastuzumab después de la inyección IV. Las mediciones de estabilidad in vivo detectan al menos dos derivados de dolastatina unidos a rastuzumab.

La Figura 15 presenta ilustraciones gráficas del cambio en el peso corporal de la rata y el volumen tumoral después del tratamiento con derivados de dolastatina unidos a trastuzumab.

La Figura 16 presenta ilustraciones gráficas de la eficacia antitumoral de trastuzumab, Her2-HS122-NCD1 y Her2-HS122/LK145-HCD1 frente a tumores establecidos de HCC1954 en ratones SCID-bg. A los ratones se les administró una única inyección IV el día 1 (flecha). Los puntos de datos representan el volumen tumoral promedio del grupo y las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

La Figura 17 presenta ilustraciones gráficas de la eficacia antitumoral de derivados de enlazador de dolastatina en el modelo de xenoinjerto de mama MDA361DYT2 (2+).

La Figura 18 presenta ilustraciones gráficas de la eficacia antitumoral de derivados de enlazador de dolastatina en el modelo de xenoinjerto de mama MDA361DYT2 (2+).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0150]** Aunque se han mostrado y descrito aquí realizaciones preferidas de la presente invención, será obvio para los expertos en la técnica que dichas realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. A los expertos en la materia se les ocurrirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Debe entenderse que varias alternativas a las realizaciones de la invención descritas en este documento se pueden emplear en la práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes se cubran de este modo.

### I. Introducción

[0151] Recientemente, se ha informado de una tecnología completamente nueva en las ciencias de las proteínas, que promete superar muchas de las limitaciones asociadas con las modificaciones específicas de sitio de las proteínas. Específicamente, se han agregado nuevos componentes a la maquinaria biosintética de proteínas de la procariota *Escherichia coli* (*E. coli*) (por ejemplo, L. Wang, et al., (2001), *Science* 292: 498-500) y la eucariota *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (por ejemplo, J. Chin y col., *Science* 301: 964-7 (2003)), que ha permitido la incorporación de aminoácidos no naturales a proteínas in vivo. Un número de nuevos aminoácidos con nuevas propiedades químicas, físicas o biológicas, incluyendo etiquetas de fotoafinidad y aminoácidos fotoisomerizables, cet aminoácidos y aminoácidos glicosilados se han incorporado de manera eficiente y con alta fidelidad en proteínas en *E. coli* y en levadura en respuesta al codón ámbar, TAG, usando esta metodología. Véase, por ejemplo, JW Chin et al., (2002), *Journal of the American Chemical Society* 124: 9026 - 9027; JW Chin, y PG Schultz, (2002), *ChemBioChem* 3 (11): 1135-1137; JW Chin, y col., (2002), *PNAS United States of America* 99 (17): 11020-11024; y, L. Wang, y PG Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1-11. Estos estudios han demostrado que es posible introducir selectiva y rutinariamente grupos funcionales químicos que no se encuentran en las proteínas, que son químicamente inertes a todos los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos genéticamente codificados y que pueden usarse para reaccionar de manera eficiente y selectiva para formar enlaces covalentes estables.

## II. Visión de conjunto

[0152] En un nivel, se describen aquí las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y usar derivados de enlazador de dolastatina o análogos que comprenden al menos un carbonilo, dicarbonilo, oxima, hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, azida, amidina, imina, diamina, ceto-amina, ceto-alquino, alquino, cicloalqueno o eno-diona. En otro nivel, se describen en este documento las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y usar derivados de enlazador de dolastatina o análogos que comprenden al menos un aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado con una oxima, amina aromática, heterociclo (por ejemplo, indol, quinoxalina, fenazina, pirazol, triazol, etc.).

[0153] Dichos derivados de enlazador de dolastatina que comprenden aminoácidos no naturales pueden contener una funcionalidad adicional, que incluye, pero no se limita a, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo polipeptídico; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de eso. Tenga en cuenta que las diversas funcionalidades antes mencionadas no implican que los miembros de una funcionalidad no puedan clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, habrá superposición dependiendo de las circunstancias particulares. A modo de ejemplo solamente, un polímero soluble en agua se solapa en su alcance con un derivado de polietilenglicol, sin embargo, el solapamiento no es completo y, por lo tanto, ambas funcionalidades se citan anteriormente.

[0154] En algunas realizaciones, se divulga un derivado de un grupo tóxico derivado que comprende un carbonilo, dicarbonilo, oxima, hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, azida, amidina, imina, diamina, ceto-amina, ceto-alquino, alquino, cicloalqueno o eno-diona. En algunas realizaciones, el derivado de grupo tóxico comprende cualquiera de los enlazadores descritos en este documento. En otras realizaciones, se describen en este documento las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y usar derivados o análogos de grupos tóxicos que comprenden al menos un aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado con una oxima, amina aromática, heterociclo (por ejemplo, indol, quinoxalina, fenazina, pirazol, triazol, etc.).

[0155] En algunas realizaciones, dichos derivados tóxicos que comprenden aminoácidos no naturales pueden contener funcionalidades adicionales, que incluyen, pero no se limitan a, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo polipeptídico; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de eso. En realizaciones específicas, el grupo tóxico es dolastatina o auristatina. En ciertas realizaciones específicas, el grupo tóxico es dolastatina-10. Tenga en cuenta que las diversas funcionalidades mencionadas anteriormente no implican que los miembros de una funcionalidad no puedan clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, habrá superposición dependiendo de las circunstancias particulares. A modo de ejemplo solamente, un polímero soluble en agua se solapa en su alcance con un derivado de polietilenglicol, sin embargo, el solapamiento no es completo y, por lo tanto, ambas funcionalidades se citan anteriormente.

[0156] Ciertas realizaciones de la presente divulgación describen preparaciones de ciertos restos tóxicos con enlazadores que reducen la toxicidad del resto in vivo mientras que el resto tóxico retiene actividad farmacológica. En algunas realizaciones, la toxicidad del grupo tóxico unido, cuando se administra a un animal o ser humano, se reduce o elimina en comparación con el grupo tóxico libre o los derivados del grupo tóxico que comprenden enlaces lábiles, mientras se retiene la actividad farmacológica. En algunas realizaciones, se pueden administrar dosis aumentadas del grupo tóxico unido (por ejemplo, derivados de enlazador de dolastatina, derivados de dolastatina unidos a aminoácidos no naturales) a animales o humanos con mayor seguridad. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de aminoácidos no naturales unidos a un resto tóxico (por ejemplo, derivado de dolastatina) proporcionan estabilidad *in vitro* e *in vivo*. En algunas realizaciones, los polipéptidos de aminoácidos no naturales

unidos a un resto tóxico (por ejemplo, derivado de dolastatina-10) son eficaces y menos tóxicos en comparación con el resto tóxico libre (por ejemplo, dolastatina-10).

### III. Derivados de enlazador de dolastatina

[0157] En un nivel, se describen en este documento las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y usar derivados o análogos de un enlazador de dolastatina que comprenden al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con un carbonilo, dicarbonilo, oxima o grupo hidroxilamina. Dichos derivados de enlazador de dolastatina que comprenden aminoácidos no naturales pueden contener funcionalidad adicional, que incluye, pero no se limita a, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo polipeptídico; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos. Tenga en cuenta que las diversas funcionalidades antes mencionadas no implican que los miembros de una funcionalidad no puedan clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, habrá superposición dependiendo de las circunstancias particulares. A modo de ejemplo solamente, un polímero soluble en agua se solapa en su alcance con un derivado de polietilenglicol, sin embargo, el solapamiento no es completo y, por lo tanto, ambas funcionalidades se citan anteriormente.

[0158] En un aspecto, los métodos para seleccionar y diseñar un derivado de enlazador de dolastatina se pueden modificar usando los métodos, las composiciones y las técnicas descritas en este documento. El nuevo derivado enlazador de dolastatina puede diseñarse de nuevo, incluso a modo de ejemplo solamente, como parte del proceso de cribado de alto rendimiento (en cuyo caso pueden diseñarse, sintetizarse, caracterizarse y/o probarse numerosos polipéptidos) o en función de los intereses del investigador. El nuevo derivado de enlazador de dolastatina también se puede diseñar basándose en la estructura de un polipéptido conocido o parcialmente caracterizado. A modo de ejemplo solamente, la dolastatina ha sido objeto de un intenso estudio por parte de la comunidad científica; se puede diseñar un nuevo compuesto basado en la estructura de dolastatina. Los principios para seleccionar qué aminoácido(s) sustituir y/o modificar se describen por separado en este documento. La elección de la modificación a emplear también se describe en este documento, y se puede usar para satisfacer la necesidad del experimentador o usuario final. Tales necesidades pueden incluir, pero no están limitadas a, manipular la eficacia terapéutica del polipéptido, mejorar el perfil de seguridad del polipéptido, ajustar la farmacocinética, farmacológicas y/o farmacodinámicas del polipéptido, tales como, a modo de ejemplo solamente, aumentar la solubilidad en agua, la biodisponibilidad, aumentar la vida media en suero, aumentando la vida media terapéutica, modulando la inmunogenicidad, modulando la actividad biológica o extendiendo el tiempo de circulación. Además, tales modificaciones incluyen, solo a modo de ejemplo, proporcionar funcionalidad adicional al polipéptido, incorporar un anticuerpo y cualquier combinación de las modificaciones mencionadas anteriormente.

[0159] También se describen aquí derivados de enlazador de dolastatina que tienen o pueden modificarse para que contengan un grupo oxima, carbonilo, dicarbonilo o hidroxilamina. Se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar tales derivados de enlazador de dolastatina.

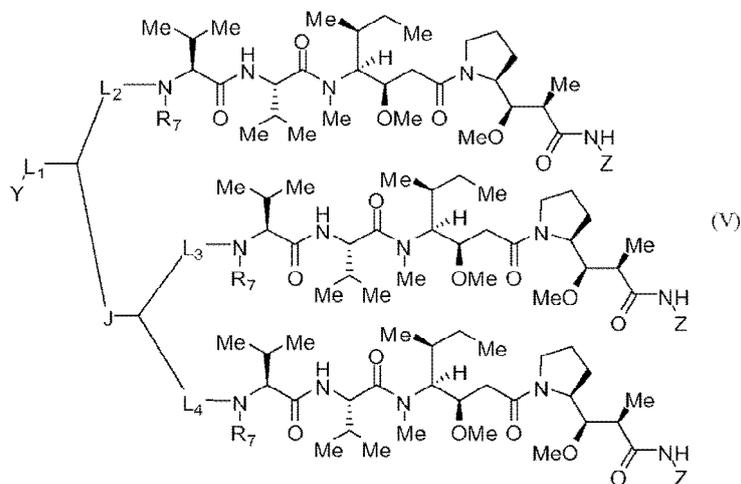
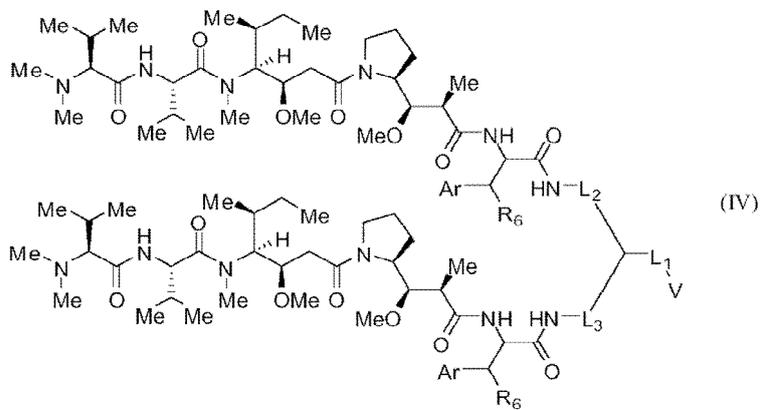
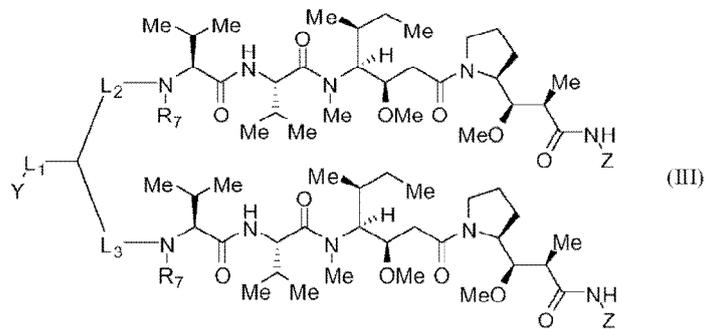
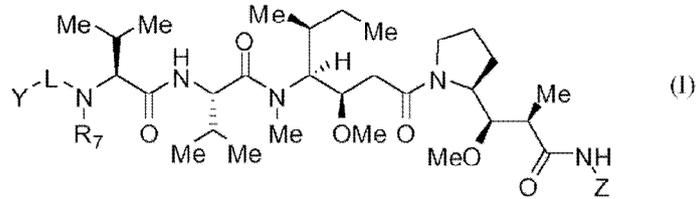
[0160] El derivado enlazador de dolastatina puede contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o diez o más de un grupo carbonilo o dicarbonilo, grupo oxima, grupo hidroxilamina o formas protegidas de los mismos. El derivado del enlazador de dolastatina puede ser el mismo o diferente, por ejemplo, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más sitios diferentes en el derivado que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más grupos reactivos diferentes.

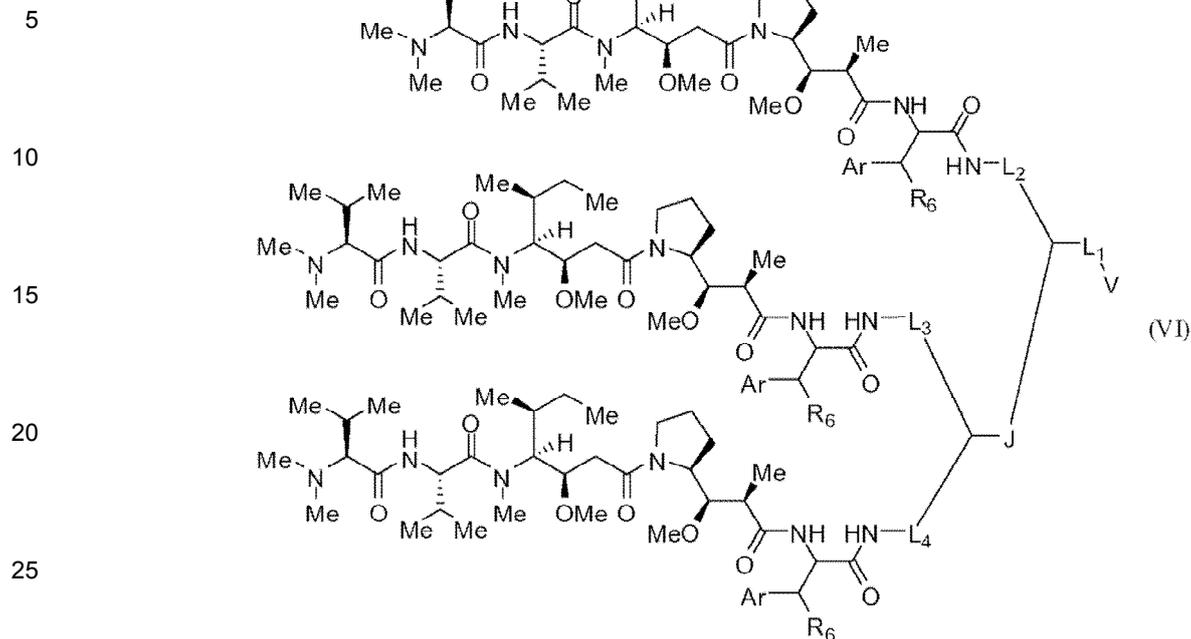
#### A. Estructura y síntesis de los derivados de enlazador de dolastatina: grupos electrofílicos y nucleófilos

[0161] Los derivados de dolastatina con enlazadores que contienen un grupo hidroxilamina (también llamado un 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 hidracinas, hidrazidas y semicarbazidas, la nucleofilicidad mejorada del grupo aminooxilo 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 similar reactividad química. Véase, 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 modo de ejemplo, cetonas, aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. En algunas realizaciones, los derivados de dolastatina con enlazadores que comprenden una azida, alquino o cicloalquino permiten la unión de moléculas mediante reacciones de cicloadición (por ejemplo, cicloadiciones 1,3-dipolares, cicloadición de azida-alquino Huisgen, etc.). (Descrito en la Patente de Estados Unidos N° 7.807.619).

[0162] Por lo tanto, en ciertas realizaciones descritas en este documento son derivados de dolastatina con enlazadores que comprenden una hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, amidina, imina, diamina, cetoamina, ceto-alquino y grupo hidroxilamina de eno-diona,

un grupo similar a la hidroxilamina (que tiene una 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 después de la desprotección). En algunas divulgaciones, los derivados de dolastatina con enlaces comprenden azidas, alquinos o cicloalquinos. La presente invención proporciona compuestos que tienen la estructura de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI):





30 en donde:

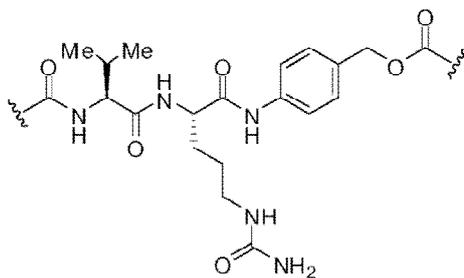
Z tiene la estructura de:



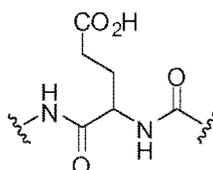
45  $R_5$  es H, COR<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o tiazol;  
 $R_8$  es OH o -NH-(alquilen-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>;  
 $R_6$  es OH o H;  
 Ar es fenilo o piridina;

50  $R_7$  es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o hidrógeno;  
 Y y V se seleccionan cada uno del grupo que consiste en una hidroxilamina;  
 L, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son cada uno de los enlazadores seleccionados del grupo que consiste en un enlace, -alquilen-  
 -, -alquilen-C(O)-, -alquilen-J-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-C(O)-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-J-,  
 -(alquilen-O)<sub>n</sub>-J-alquilen-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(Me)<sub>2</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-(alquilen-O)<sub>n</sub>-  
 alquilen-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-W-, -alquilen-C(O)-W-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-J-, -alquilen'-J-(alquilen-  
 O)<sub>n</sub>-alquilen-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-J-alquilen', -J-(alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-J-  
 (alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen- J'-, -W-, -alquilen-W-, alquilen'-J-(alquilen-NMe)<sub>n</sub>-alquilen-W-, -J-(alquilen-NMe)<sub>n</sub>-  
 alquilen-W-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-U-alquilen-C(O)-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-U-alquilen-; -J-alquilen-  
 NMe-alquilen-NMe-alquilen"-W-, y -alquilen-J-alquilen'-NMe-alquilen"-NMe-alquilen' " - W-;

60 W tiene la estructura de:



U tiene la estructura de:



cada J y J' tienen independientemente la estructura de:

cada n, n', n'', n''', n'''' y n''''' son independientemente enteros mayores que o iguales a uno; y o L está ausente, Y es metilo, R<sub>5</sub> es COR<sub>8</sub> y R<sub>8</sub> es -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>.

Tales derivados de enlazador de dolastatina pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0163]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), R<sub>5</sub> es tiazol o ácido carboxílico. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), R<sub>5</sub> es hidrógeno. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), R<sub>5</sub> es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), R<sub>5</sub> es -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, donde alquileo es -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (IV) y (VI), R<sub>5</sub> es -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

**[0164]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), R<sub>6</sub> es H. En algunas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), R<sub>6</sub> es hidroxilo.

**[0165]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), Ar es fenilo.

**[0166]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), R<sub>7</sub> es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), R<sub>7</sub> es hidrógeno.

**[0167]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), cada L, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> es independientemente un enlazador escindible o no enlazador escindible. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), cada L, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> es independientemente un enlazador derivatizado de oligo (etilenglicol).

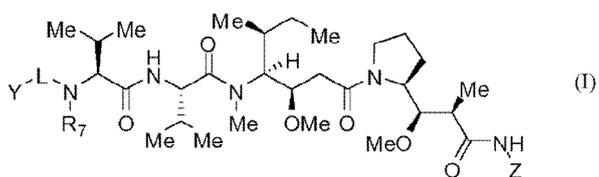
**[0168]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), cada alquileo, alquileo', alquileo'' y alquileo''' es independientemente -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (XIV), (XV), (XVI), (XVII) y (XVIII), cada n, n', n'', n''', y n'''' es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36,

37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100.

5 **B. Estructura y síntesis de los derivados de Enlazador de Dolastatina: grupos de hidroxilamina**

[0169] Los derivados de dolastatina de la invención tienen enlazadores que comprenden un grupo hidroxilamina. Dichos derivados de enlazador de dolastatina incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (I):

10

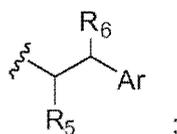


15

en donde:

20 Z tiene la estructura de:

25



30 R<sub>5</sub> es H, COR<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o tiazol;

R<sub>8</sub> es OH o -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>;

R<sub>6</sub> es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

35 R<sub>7</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o hidrógeno;

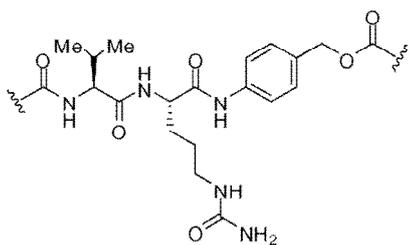
Y es NH<sub>2</sub>-O-;

L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en -alquileo-, -alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(Me)<sub>2</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-W-, -alquileo-C(O)-W-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-U-alquileo-C(O)- y -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-U-alquileo-;

40

W tiene la estructura de:

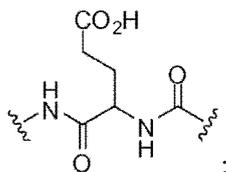
45



50

55 U tiene la estructura de:

60



65 o L está ausente, Y es metilo, R<sub>5</sub> es COR<sub>8</sub>, y R<sub>8</sub> es -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>; y

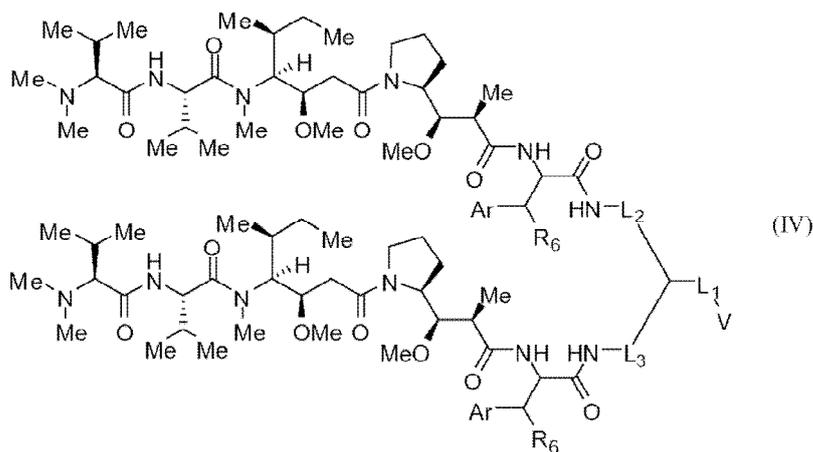
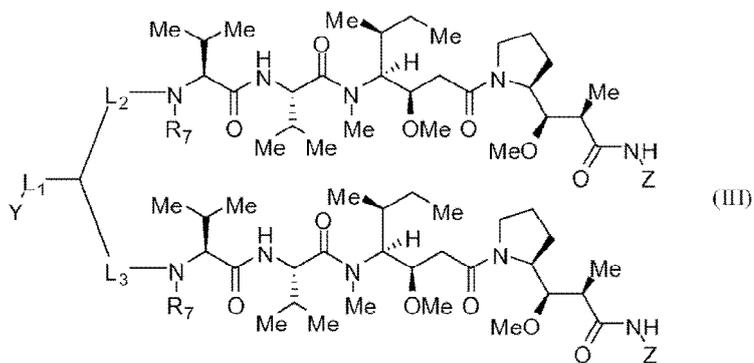


independientemente un enlazador derivatizado de oligo(etilenglicol).

**[0178]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (II), R<sub>7</sub> es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (II), R<sub>7</sub> es hidrógeno.

**[0179]** En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), alquileo es -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), cada n, n', n'', n''', y n'''' es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

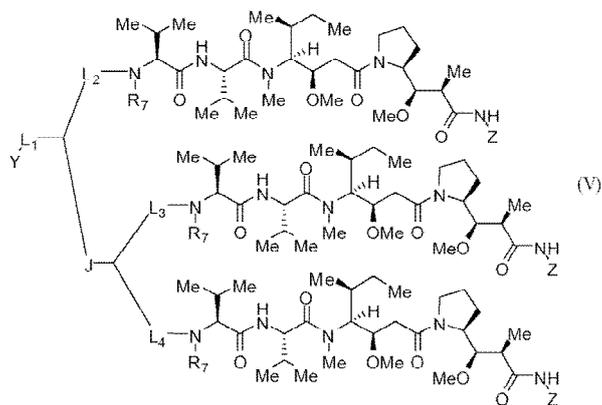
**[0180]** Dichos derivados de enlazador de dolastatina incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI):



5

10

15

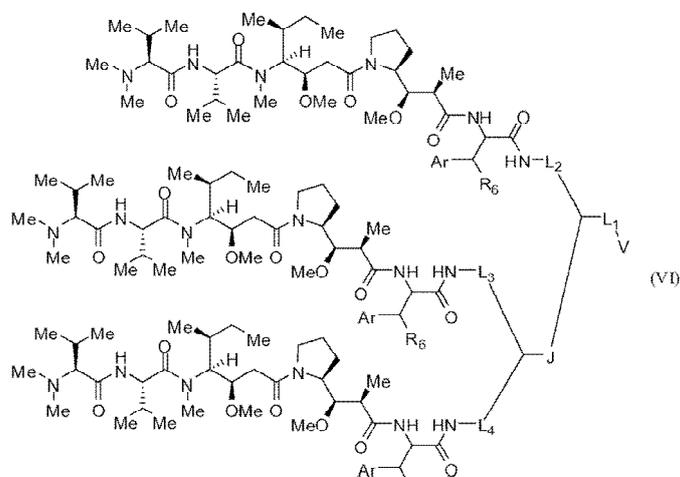


20

25

30

35

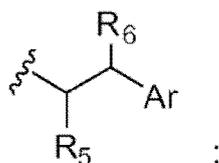


en donde:

40

Z tiene la estructura de:

45



50

R<sub>5</sub> es H, COR<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o tiazol;  
 R<sub>8</sub> es OH;  
 R<sub>6</sub> es OH o H;  
 Ar es fenilo o piridina;

55

R<sub>7</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o hidrógeno;  
 Y es NH<sub>2</sub>-O-;  
 V es -O-NH<sub>2</sub>

60

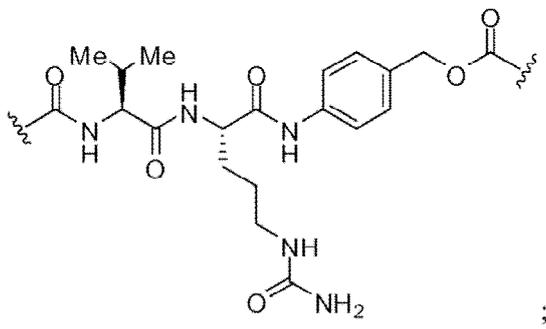
L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son cada uno de los enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en un enlace, -alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-, -alquileo'-J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J'-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-alquileo-', -W-, -alquileo-W-, alquileo'-J-(alquileo-NMe)<sub>n</sub>-alquileo-W-, -J-(alquileo-NMe)<sub>n</sub>-alquileo-W-, -J-alquileo-NMe-alquileo-NMe-alquileo"-W-, y -alquileo-J-alquileo'-NMe-alquileo"-NMe-alquileo"-W-;

W tiene la estructura de:

5

10

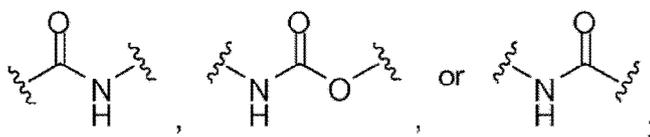
15



20

25

cada J y J' tienen independientemente la estructura de:



y

cada n y n' son independientemente enteros mayores que o iguales a uno.

30

Tales derivados de enlazador de dolastatina pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

35

**[0181]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), R<sub>5</sub> es tiazol. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), R<sub>6</sub> es H. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), Ar es fenilo. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), R<sub>7</sub> es metilo. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), n y n' son números enteros de 0 a 20. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), n y n' son números enteros de 0 a 10. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), n y n' son números enteros de 0 a 5.

45

**[0182]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III) y (V), R<sub>5</sub> es tiazol o ácido carboxílico. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III) y (V), R<sub>5</sub> es hidrógeno. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III) y (V), R<sub>5</sub> es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III) y (V), R<sub>5</sub> es -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, donde alquileo es -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III) y (V), R<sub>5</sub> es -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

55

**[0183]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), R<sub>6</sub> es H. En algunas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), R<sub>6</sub> es hidroxilo.

**[0184]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), Ar es fenilo.

60

**[0185]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), R<sub>7</sub> es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), R<sub>7</sub> es hidrógeno.

65

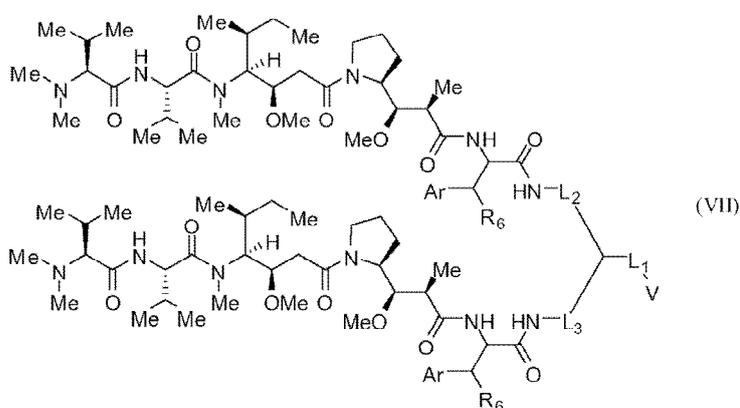
**[0186]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (XIV), (XV), (XVI), (XVII) y (XVIII), cada L, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> es independientemente un enlazador escindible o no enlazador escindible. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (XIV), (XV), (XVI), (XVII) y (XVIII), cada L, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> es independientemente un

enlazador derivatizado de oligo (etilenglicol).

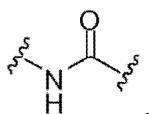
[0187] En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), cada alquileo, alquileo', alquileo" y alquileo" es independientemente -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, --CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, o CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno.

[0188] En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), cada n y n' es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100.

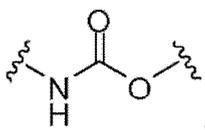
[0189] En ciertas realizaciones, los derivados de enlazador de dolastatina incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (VII):



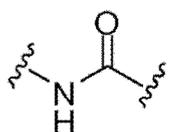
[0190] En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (VII), L<sub>1</sub> es -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-, L<sub>2</sub> es -alquileo'- J' -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, L<sub>3</sub> es -J''-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, alquileo es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, alquileo' es -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, n es 1, n' y n'' son 3, J tiene la estructura de



J' y J'' tienen la estructura de



y R<sub>7</sub> es metilo. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (VII), L<sub>1</sub> es -J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, L<sub>2</sub> es -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo'-J'-alquileo'-, L<sub>3</sub> es -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo'-J''-, alquileo es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, alquileo' es -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, n es 1, n' y n'' son 4, y J, J' y J'' tienen la estructura de



Tales derivados de enlazador de dolastatina pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

[0191] En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I) - (VII) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I) - (VII) son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I) - (VII) son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, tales condiciones ácidas son de pH 2 a 8.

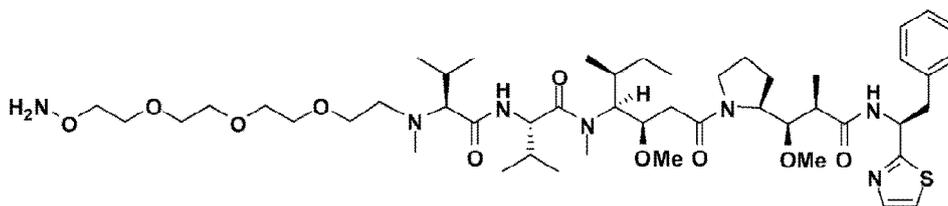
[0192] Los métodos y composiciones proporcionadas y descritas en la presente memoria incluyen polipéptidos que comprenden un derivado enlazador de dolastatina que contiene al menos un grupo carbonilo o dicarbonilo, grupo oxima, grupo hidroxilamina, o formas protegidas o enmascaradas de los mismos. La introducción de al menos un grupo reactivo en un derivado enlazador de dolastatina puede permitir la aplicación de químicas de conjugación que implican reacciones químicas específicas, que incluyen, pero no se limitan a, con uno o más derivados del enlazador de dolastatina sin reaccionar con el aminoácidos. Una vez incorporadas, las cadenas laterales del derivado enlazador de dolastatina también se pueden modificar utilizando metodologías químicas descritas en este documento o adecuadas para los grupos funcionales particulares o sustituyentes presentes en el derivado del enlazador de dolastatina.

[0193] Los métodos y composiciones derivadas de enlazador de dolastatina descritas en este documento proporcionan conjugados de sustancias que tienen una amplia variedad de grupos funcionales, sustituyentes o restos, con otras sustancias que incluyen, pero no se limitan a, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo polipeptídico; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos.

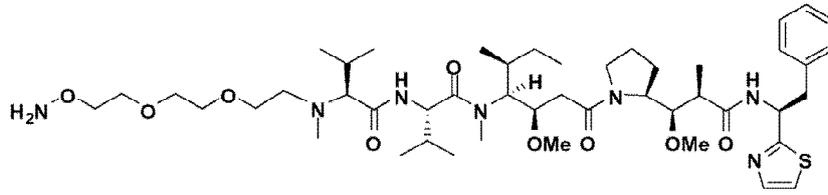
[0194] En ciertas realizaciones, los derivados de enlazador de dolastatina, ligadores y reactivos descritos en este documento, que incluyen compuestos de Fórmulas (I) - (VII) son estables en solución acuosa en condiciones ligeramente ácidas (que incluyen pero no se limitan a pH 2 a 8). En otras realizaciones, dichos compuestos son estables durante al menos un mes en condiciones ligeramente ácidas. En otras realizaciones, dichos compuestos son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En otras realizaciones, tales compuestos son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas.

[0195] En otro aspecto de las composiciones, los métodos, técnicas y estrategias descritas en la presente memoria son métodos para estudiar o usar cualquiera de los derivados de dolastatina de aminoácidos no naturales "modificados o no modificados" anteriormente mencionados. Incluidos en este aspecto, a modo de ejemplo solamente, están los usos terapéuticos, diagnósticos, basados en ensayos, industriales, cosméticos, biología vegetal, medioambientales, de producción de energía, productos de consumo y/o militares que se beneficiarían de un derivado enlazador de dolastatina que comprende un polipéptido o proteína de aminoácido no natural "modificado o no modificado".

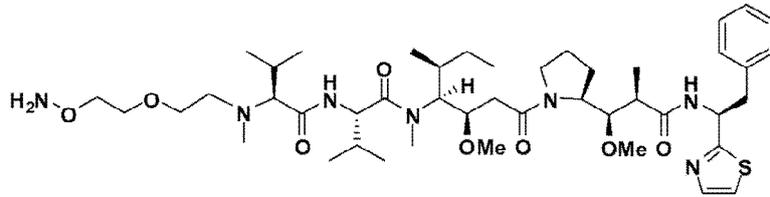
[0196] Los ejemplos no limitantes de derivados de enlazador de dolastatina incluyen:



5

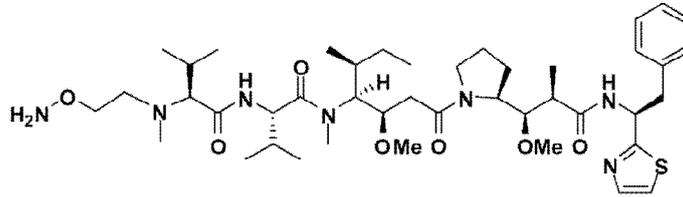


10



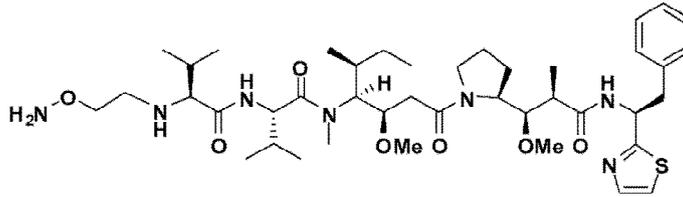
15

20



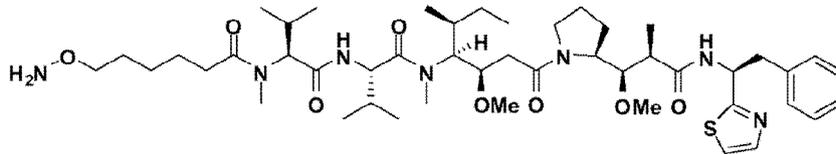
25

30

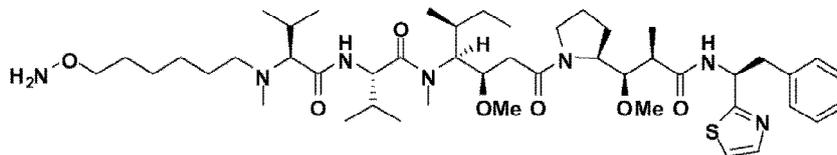


35

40

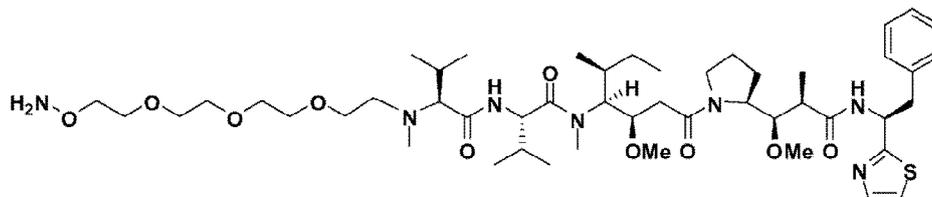


45

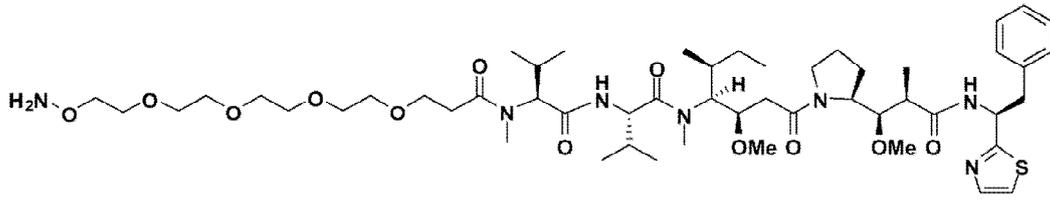


50

55

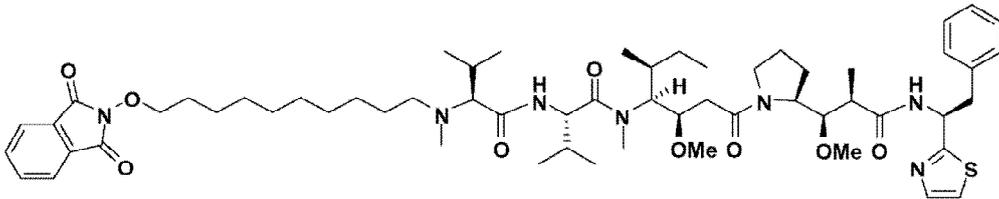


5



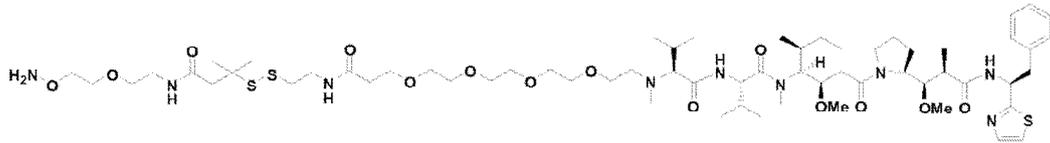
10

15



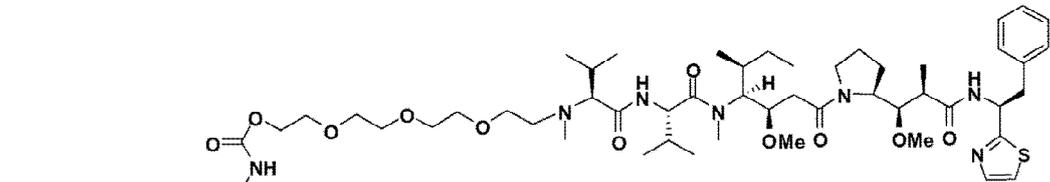
20

25



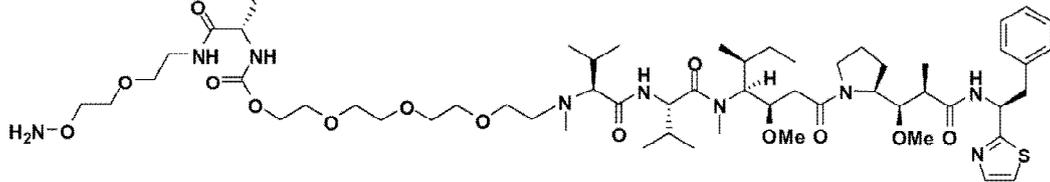
30

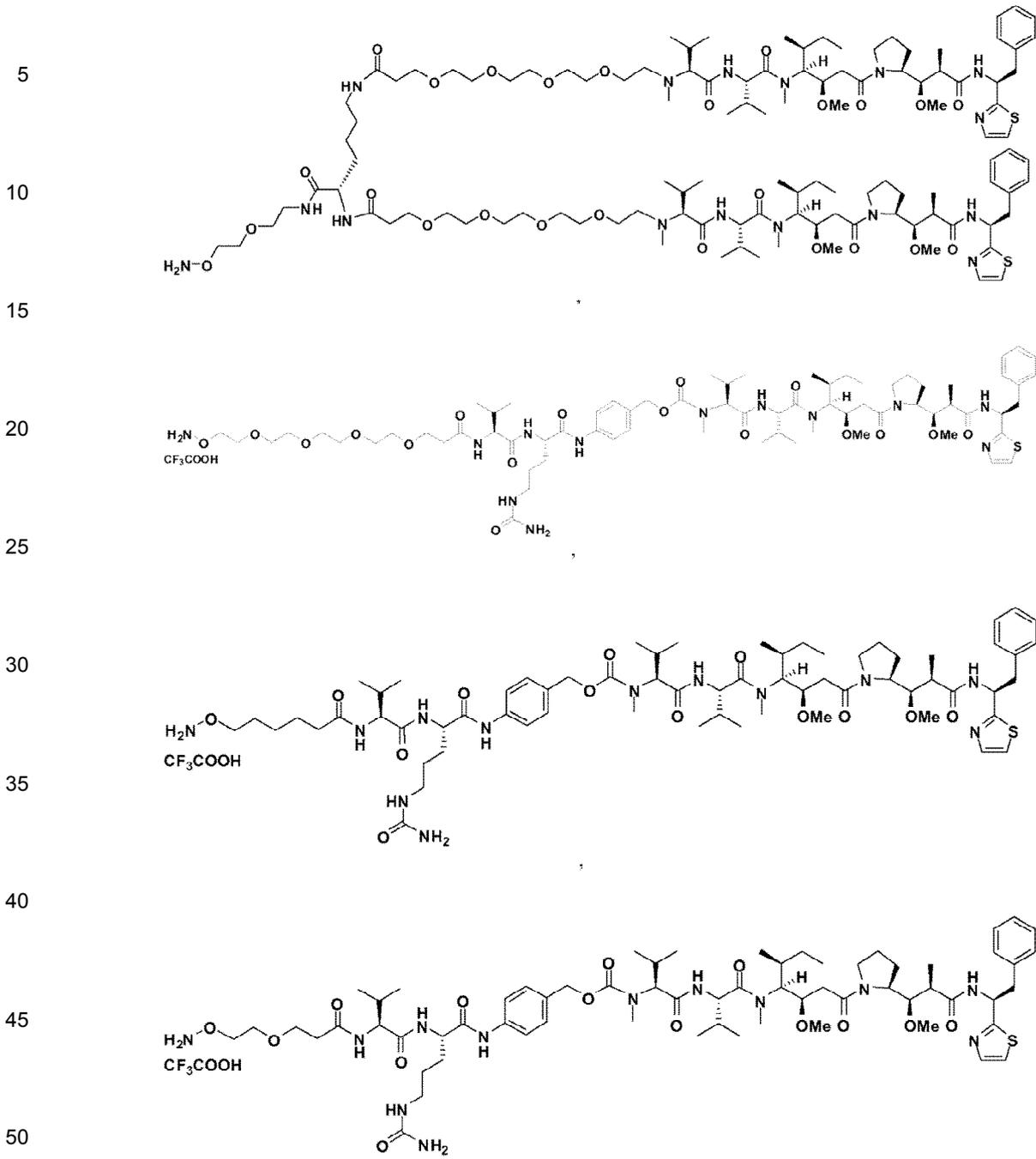
35



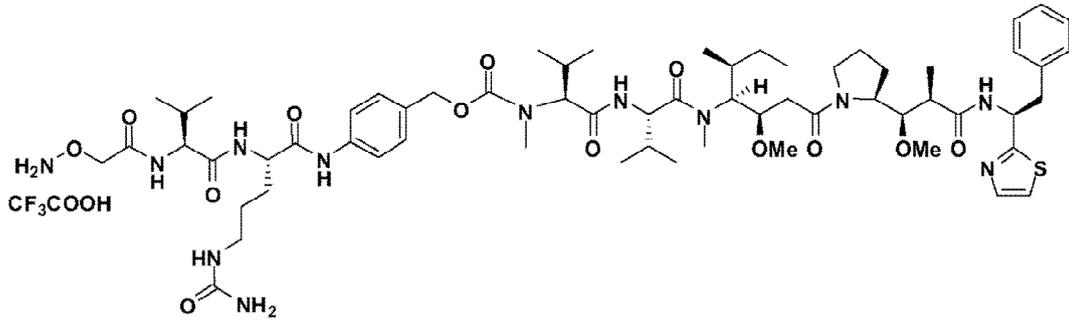
40

45



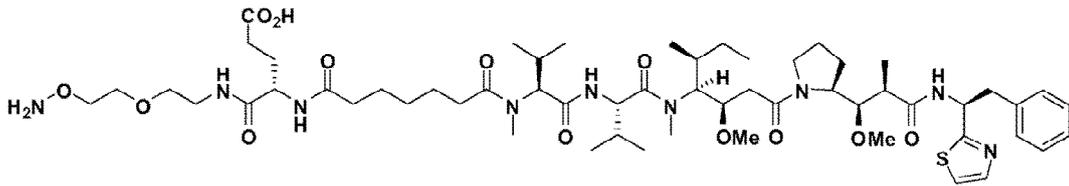


5



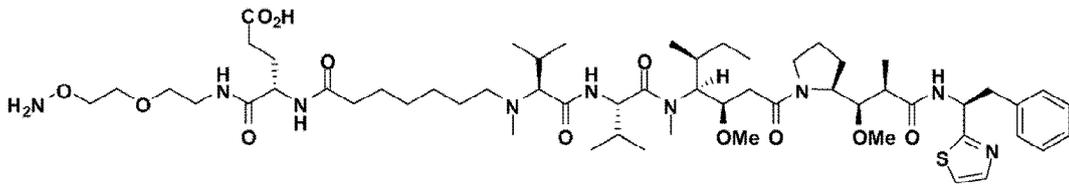
10

15



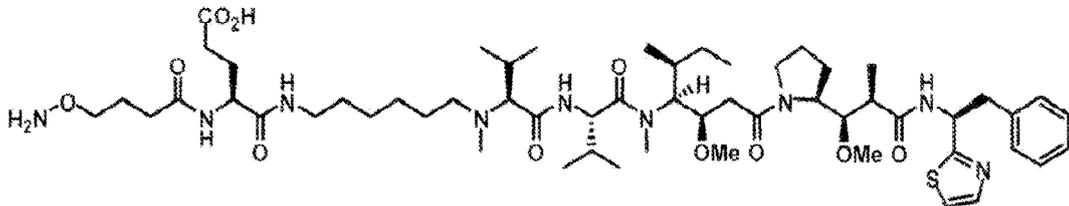
20

25



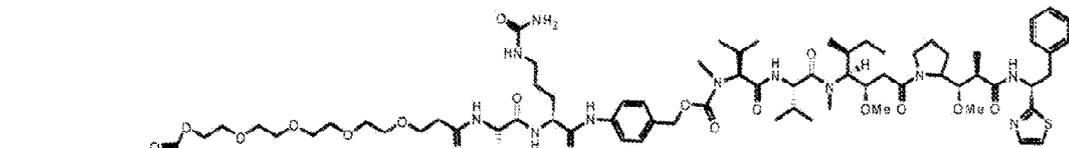
30

35



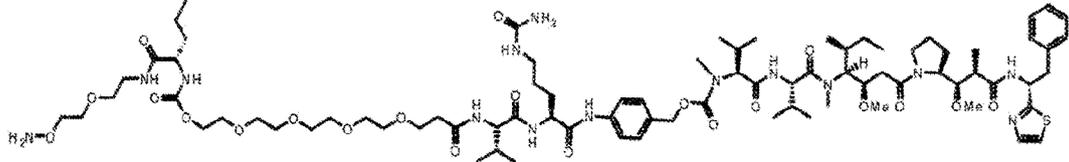
40

45

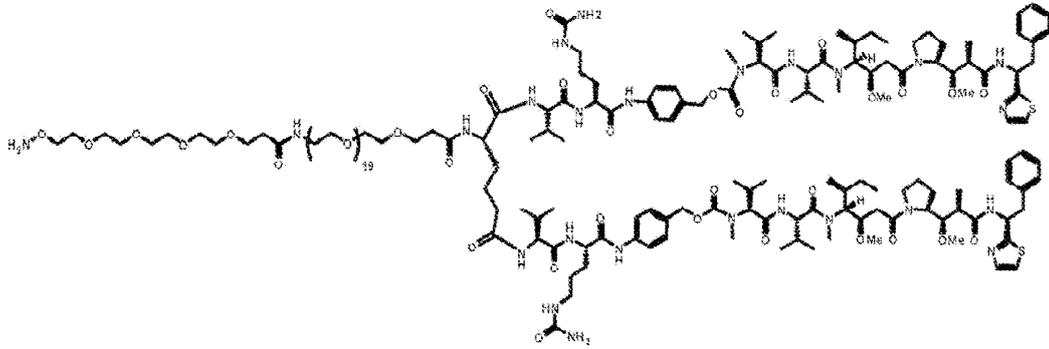


50

55



5



10

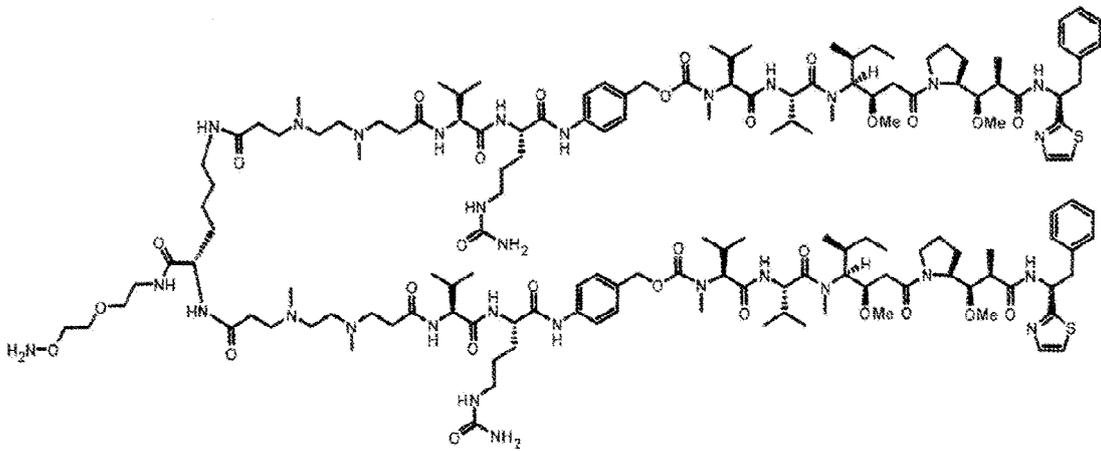
15

20

25

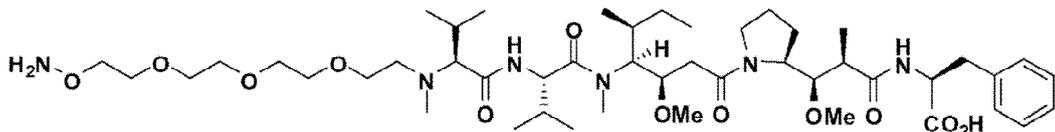
30

35

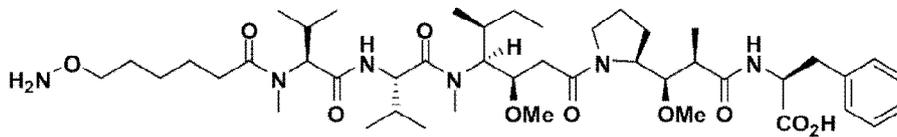


40

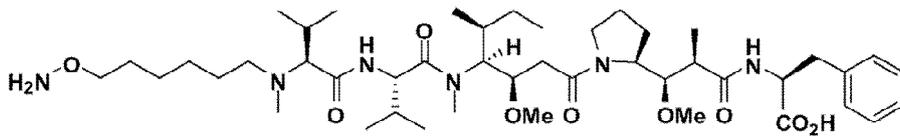
45



50

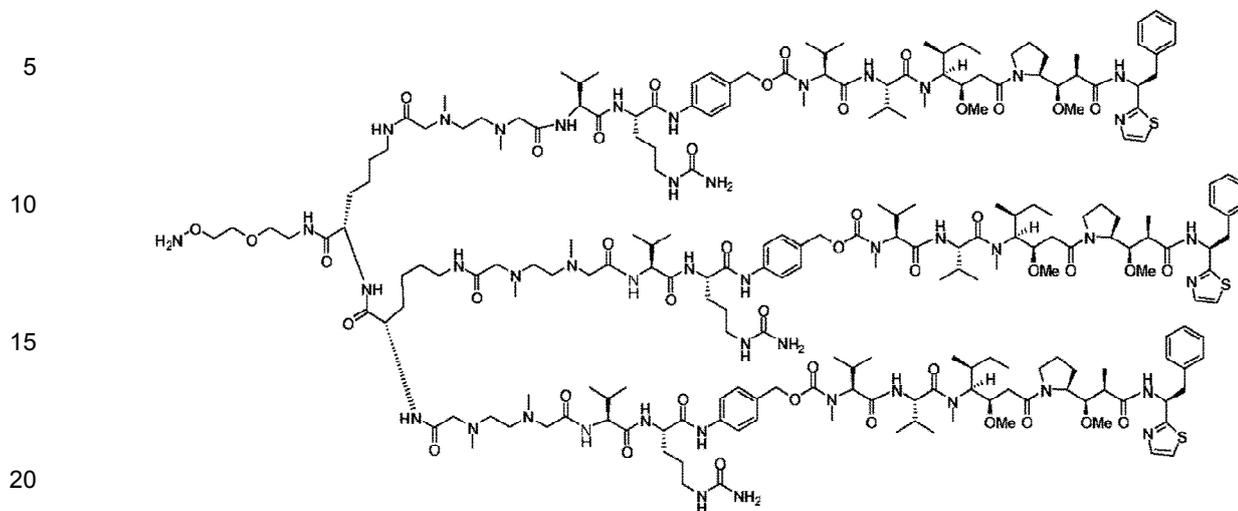


55



60

y



#### IV. Derivados de aminoácidos no naturales

25

30

35

40

45

[0197] Los aminoácidos no naturales usados en los métodos y composiciones descritas en este documento tienen 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 a la reactividad química de los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina), o al menos ortogonal a la reactividad química de los aminoácidos naturales presentes en el polipéptido que incluye el aminoácido no natural; (2) los aminoácidos no naturales introducidos son sustancialmente inertes químicamente hacia los 20 aminoácidos codificados genéticamente, comunes; (3) el aminoácido no natural puede incorporarse de forma estable en un polipéptido, preferiblemente con la estabilidad proporcional a los aminoácidos de origen natural o en condiciones fisiológicas típicas, y aún más preferentemente tal incorporación puede producirse a través de un sistema *in vivo*; y (4) el aminoácido no natural incluye un grupo funcional oxima o un grupo funcional que puede transformarse en un grupo oxima al reaccionar con un reactivo, preferiblemente en condiciones que no destruyen las propiedades biológicas del polipéptido que incluye el aminoácido no natural (a menos, por supuesto, que tal destrucción de propiedades biológicas es 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. Se puede introducir cualquier número de aminoácidos no naturales en el polipéptido. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir oximas protegidas o enmascaradas o grupos protegidos o enmascarados que pueden transformarse en un grupo oxima después de la desprotección del grupo protegido o desenmascarar al grupo enmascarado. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir grupos carbonilo o dicarbonilo protegidos o enmascarados, que pueden transformarse en un grupo carbonilo o dicarbonilo después de la desprotección del grupo protegido o desenmascarar al grupo enmascarado y, por lo tanto, están disponibles para reaccionar con hidroxilaminas u oximas para formar grupos oxima.

50

55

60

[0198] Los aminoácidos no naturales que se pueden usar en los métodos y composiciones descritas en la presente memoria incluyen, entre otros, aminoácidos que comprenden un aminoácido con nuevos grupos funcionales, aminoácidos que interaccionan de forma covalente o no covalente con otras moléculas, aminoácidos glicosilados tales como serina sustituida con azúcar, otros aminoácidos modificados con carbohidratos, aminoácidos que contienen cetona, aminoácidos que contienen aldehído, aminoácidos que comprenden polietilenglicol u otros poliéteres, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, escindibles químicamente y/o aminoácidos fotoescindibles, aminoácidos con cadenas laterales alargadas en comparación con 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 enlazados con carbono que contienen azúcar, aminoácidos activos redox, aminoácidos que contienen amino tioácido y aminoácidos que comprenden uno o más restos tóxicos.

65

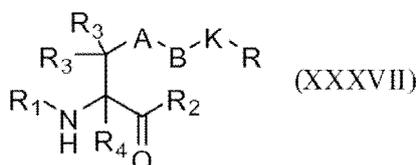
[0199] En algunas divulgaciones, los aminoácidos no naturales comprenden un resto sacárido. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen N-acetilo-L-glucosaminilo-L-serina, N-acetilo-L-galactosaminilo-L-serina, N-acetilo-L-glucosaminilo-L-treonina, N-acetilo-L-glucosaminilo-L-asparagina y O-mannosaminilo-L-serina. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen ejemplos en los que el enlace N u O 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, oxima, un tioéter, una amida y similares. Los ejemplos de tales aminoácidos también

incluyen sacáridos que no se encuentran comúnmente en proteínas de origen natural tales como 2-desoxi-glucosa, 2-desoxigalactosa y similares.

[0200] Los restos químicos incorporados en polipéptidos a través de la incorporación de aminoácidos no naturales en tales polipéptidos ofrecen una variedad de ventajas y manipulaciones de polipéptidos. Por ejemplo, la reactividad única de un grupo funcional carbonilo o dicarbonilo (que incluye un grupo funcional ceto o aldehído) permite la modificación selectiva de proteínas con cualquiera de varios reactivos que contienen hidrazina o hidroxilamina *in vivo* e *in vitro*. Un átomo pesado de aminoácidos no naturales, por ejemplo, puede ser útil para la fase de los datos de la estructura de rayos X. La introducción específica del sitio de átomos pesados que usan aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad al elegir posiciones para átomos pesados. Los aminoácidos fotorreactivos no naturales (que incluyen pero no se limitan a, aminoácidos con benzofenona y arilazidas (que incluyen, pero no se limitan a, fenilazida) cadenas laterales), por ejemplo, permiten una fotorreticulación eficaz *in vivo* e *in vitro* de polipéptidos. Los ejemplos de aminoácidos fotorreactivos no naturales incluyen, pero no se limitan a, p-azido-fenilalanina y p-benzoilo-fenilalanina. El polipéptido con los aminoácidos fotorreactivos no naturales se puede reticular entonces a voluntad por excitación del control temporal que proporciona el grupo fotorreactivo. En un ejemplo no limitativo, el grupo metilo de un amino no natural se puede sustituir con un marcador isotópico, que incluye, pero no se limita a, con un grupo 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.

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

[0201] Los aminoácidos con un grupo reactivo electrófilo permiten una variedad de reacciones para unir moléculas a través de diversas reacciones químicas, que incluyen, pero no se limitan a, reacciones de adición nucleofílicas. Dichos grupos electrófilos reactivos incluyen un grupo carbonilo o dicarbonilo (que incluye un grupo ceto o aldehído), un grupo similar al carbonilo o al tipo dicarbonilo (que tiene una reactividad similar a un 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 dicarbonilo protegido con carbonilo o protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo o dicarbonilo después de la desprotección). Tales aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXVII):

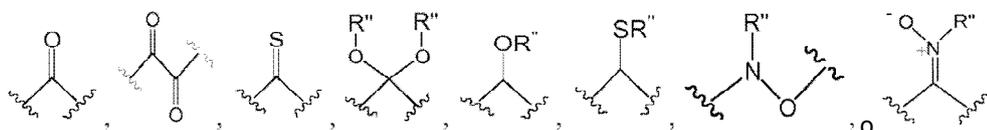


en donde:

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

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

K es



R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; cada R'' es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido o un grupo protector, o cuando hay más de un grupo

R" presente, dos R" forman opcionalmente un heterocicloalquilo;

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

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

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

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

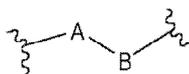
o el grupo -K-R forma conjuntamente un cicloalquilo o heterocicloalquilo monocíclico o bicíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, que incluye un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, que incluye un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, que incluye un grupo dicarbonilo enmascarado;

con la condición de que cuando A es fenileno y cada R<sub>3</sub> es H, B está presente; y que cuando A es -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- y cada R<sub>3</sub> es H, B no es -NHC(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-; y que cuando A y B están ausentes y cada R<sub>3</sub> es H, R no es metilo. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0202]** En ciertas divulgaciones, los compuestos de Fórmula (XXXVII) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas divulgaciones, los compuestos de Fórmula (XXXVII) son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas divulgaciones, los compuestos de Fórmula (XXXVII) son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas divulgaciones, tales condiciones ácidas son de pH 2 a 8.

**[0203]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), B es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(R')=N-N(R')-, -N(R')CO-, -C(O)-, -C(R')=N-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)(alquileo o alquileo sustituido)- o -S(O)<sub>2</sub>(alquileo o alquileo sustituido)-. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), B es -O(CH<sub>2</sub>)-, -CH=N-, -CH=N-NH-, -NHCH<sub>2</sub>-, -NHCO-, -C(O)-, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)-, -CONH-(CH<sub>2</sub>)-, -SCH<sub>2</sub>-, -S(=O)CH<sub>2</sub>-, o -S(O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R es alquilo C<sub>1-6</sub> o cicloalquilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII) R es -CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o ciclopropilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R<sub>1</sub> es H, terc-butiloxicarbonilo (Boc), 9-Fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), N-acetilo, tetrafluoroacetilo (TFA) o benciloxicarbonilo (Cbz). En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R<sub>1</sub> es una resina, aminoácido, polipéptido, anticuerpo o polinucleótido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R<sub>2</sub> es OH, O-metilo, O-etilo u O-*t*-butilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R<sub>2</sub> es una resina, aminoácido, polipéptido, anticuerpo o polinucleótido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R<sub>2</sub> es un polinucleótido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R<sub>2</sub> es ácido ribonucleico (ARN).

**[0204]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII),



se selecciona del grupo que consiste en:

(i) A es alquileo inferior sustituido, C<sub>4</sub>-arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

B es opcional, y cuando está presente, es un ligador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -NS(O)<sub>2</sub>-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -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)<sub>2</sub>N(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-;

(ii) A es opcional, y cuando está presente, es alquileo inferior sustituido, C<sub>4</sub>-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, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -NS(O)<sub>2</sub>-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -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)<sub>2</sub>N(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-;

(iii) A es alquileo inferior;

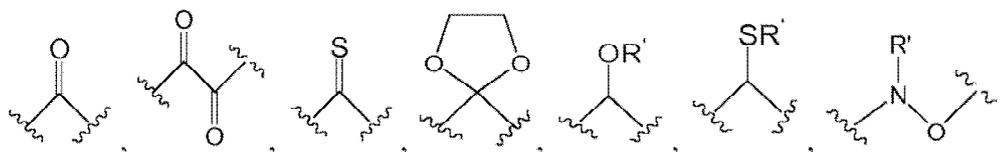
B es opcional, y cuando está presente, es un ligador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo

sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -NS(O)<sub>2</sub>-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CSN(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R'), -S(O)<sub>2</sub>N(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-; y

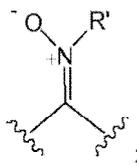
(iv) A es fenileno;

B es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -NS(O)<sub>2</sub>-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -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)<sub>2</sub>N(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-;

K es



o



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

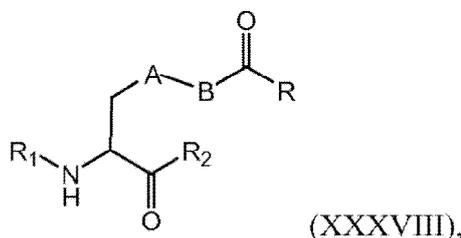
R<sub>1</sub> es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

cada R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido;

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

**[0205]** Además, se describen los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXVIII):



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 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)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)<sub>2</sub>-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o

alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

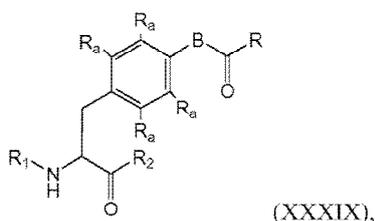
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

con la condición de que cuando A es fenileno, B está presente; y que cuando A es -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, B no es -NHC(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-; y que cuando A y B están ausentes, R no es metilo. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0206]** Además, se describen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXIX):



en donde:

B 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)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)<sub>2</sub>-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

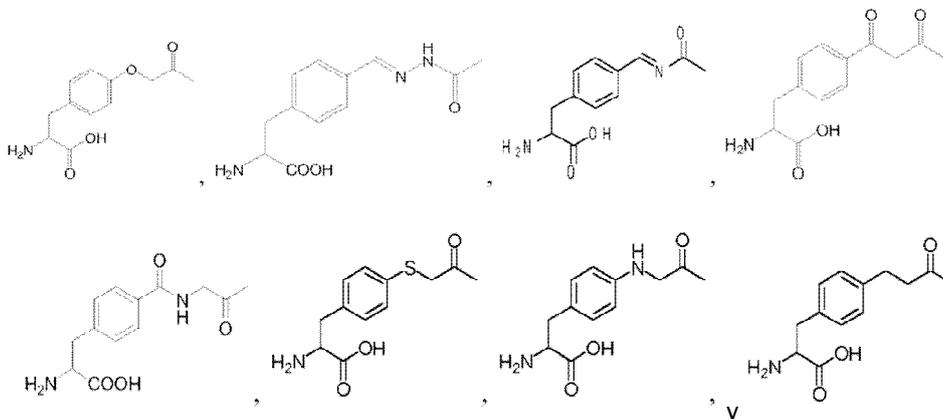
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

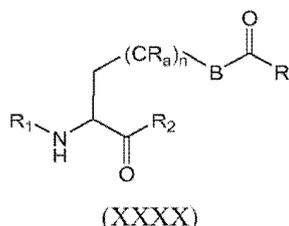
cada Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>-, -C(O)kR' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>-, -OR', y -S(O)<sub>k</sub>R', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0207]** Además, se describen los siguientes aminoácidos:



Dichos aminoácidos no naturales pueden ser opcionalmente grupos amino protegidos, protegido por carboxilo y/o en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y opcionalmente postraduccionalmente modificado.

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



en donde

-NS(O)<sub>2</sub><sup>-</sup>, -OS(O)<sub>2</sub><sup>-</sup>, 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)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o sustituido alquileo)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

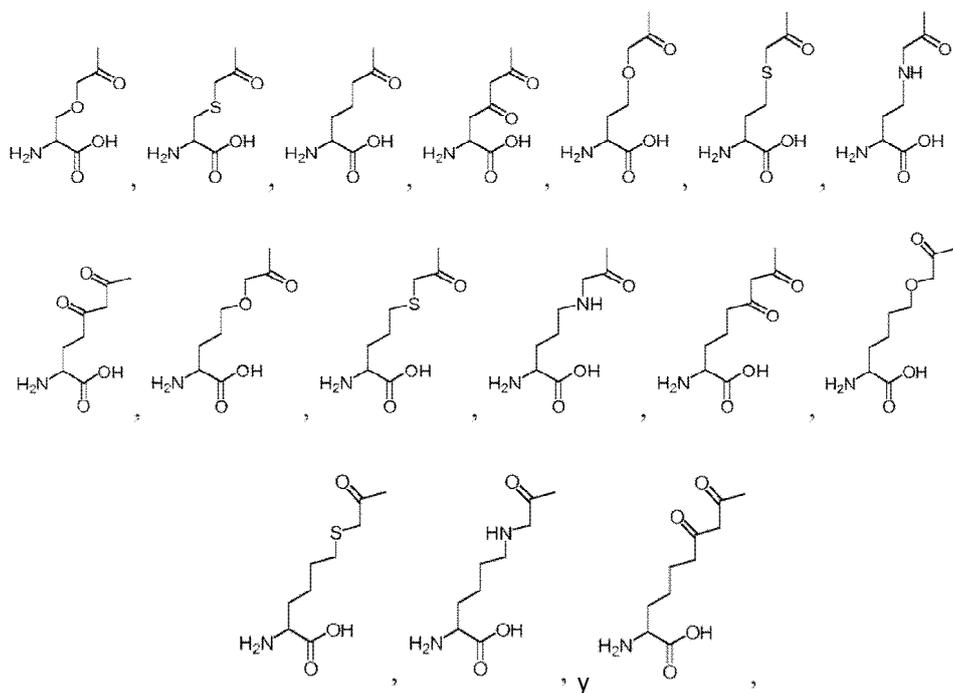
R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

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

con la condición de que cuando A es -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, B no es -NHC(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

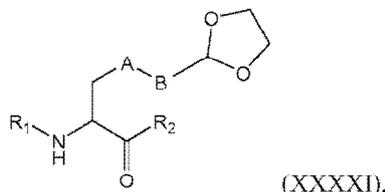
[0209] Además, se describen los siguientes aminoácidos:



en donde dichos compuestos están opcionalmente protegidos con amino, opcionalmente protegidos con carboxilo, opcionalmente protegidos con amino y carboxilo, o una sal del mismo, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y opcionalmente postraduccionalmente modificado.

5 **[0210]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXI):

10



15

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, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior sustituido, heterocicloalquileo inferior, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

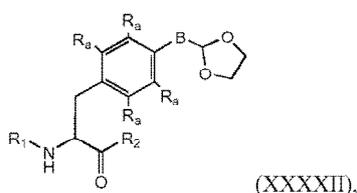
B es opcional, y cuando está presente, es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-,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

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

35 Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

40 **[0211]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXII):

45



50

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)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)<sub>2</sub>-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

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

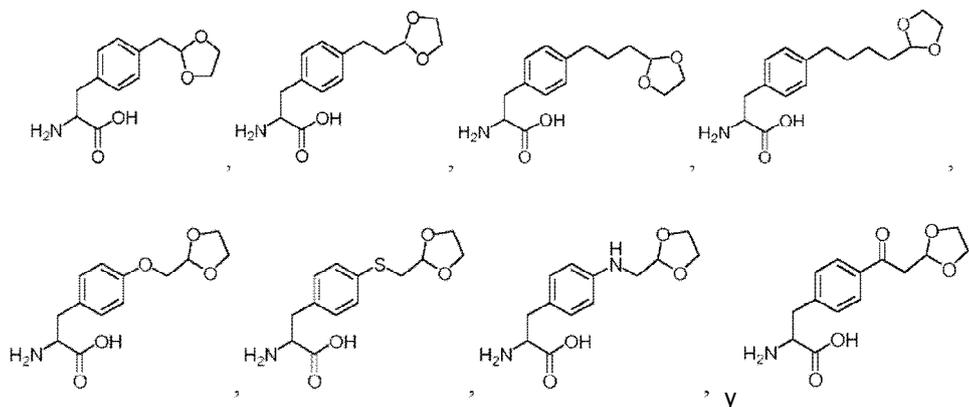
R<sub>2</sub> es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; en donde cada R<sub>a</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>-, -C(O)<sub>k</sub>R' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>-, -OR', y -S(O)<sub>k</sub>R', donde cada R' es independientemente H, alquilo o

65

alquilo sustituido.

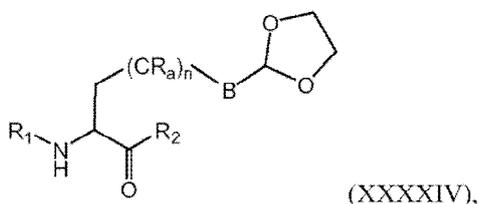
Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

[0212] Además, se describen los siguientes aminoácidos:



en donde dichos compuestos están opcionalmente protegidos con amino, opcionalmente protegidos con carboxilo, opcionalmente protegidos con amino y carboxilo, o una sal de los mismos, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y opcionalmente postraduccionalmente modificado.

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



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)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)<sub>2</sub>-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

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

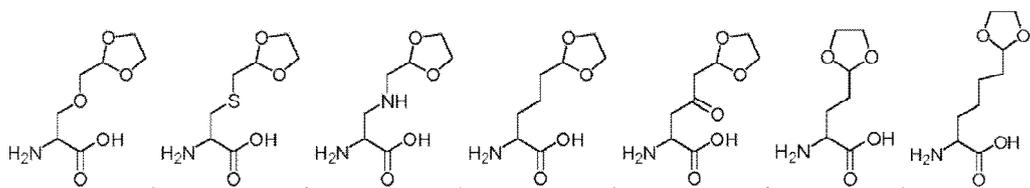
R<sub>2</sub> es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

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

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

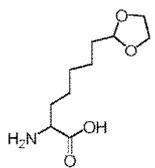
[0214] Además, se describen los siguientes aminoácidos:

5



10 y

15



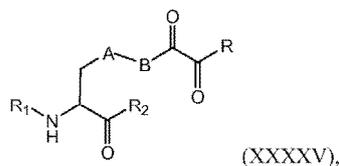
20

en donde dichos compuestos están opcionalmente protegidos con amino, opcionalmente protegidos con carboxilo, opcionalmente protegidos con amino y carboxilo, o una sal del mismo, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y opcionalmente postraduccionalmente modificado.

25

**[0215]** Además de las estructuras de monocarbonilo, los aminoácidos no naturales descritos en la presente pueden incluir grupos tales como dicarbonilo, dicarbonilo, dicarbonilo enmascarado y grupos dicarbonilo protegidos. Por ejemplo, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXV):

30



35

en donde,

40

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

45

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

50

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

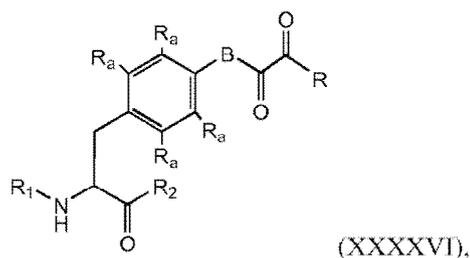
55

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

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

60

**[0216]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXVI):



en donde,

15 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)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)<sub>2</sub>-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

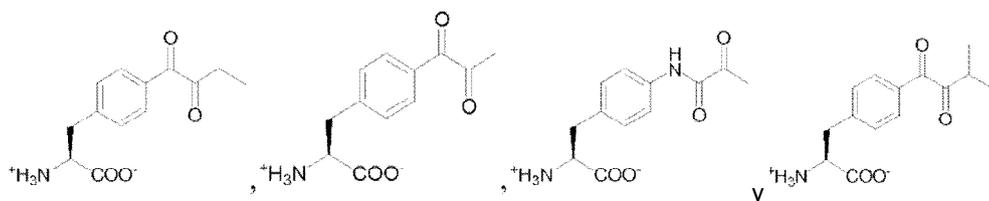
25 R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

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

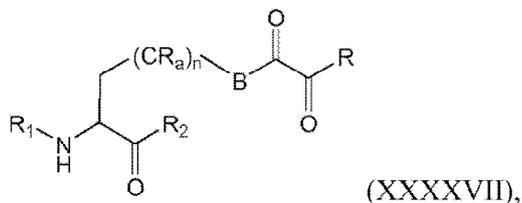
Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

35 [0217] Además, se describen los siguientes aminoácidos:



en donde tales compuestos están opcionalmente protegidos con amino y protegidos con carboxilo, o una sal del mismo. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

50 [0218] Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXVII):



en donde,

65 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,

heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub> donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)<sub>2</sub>-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

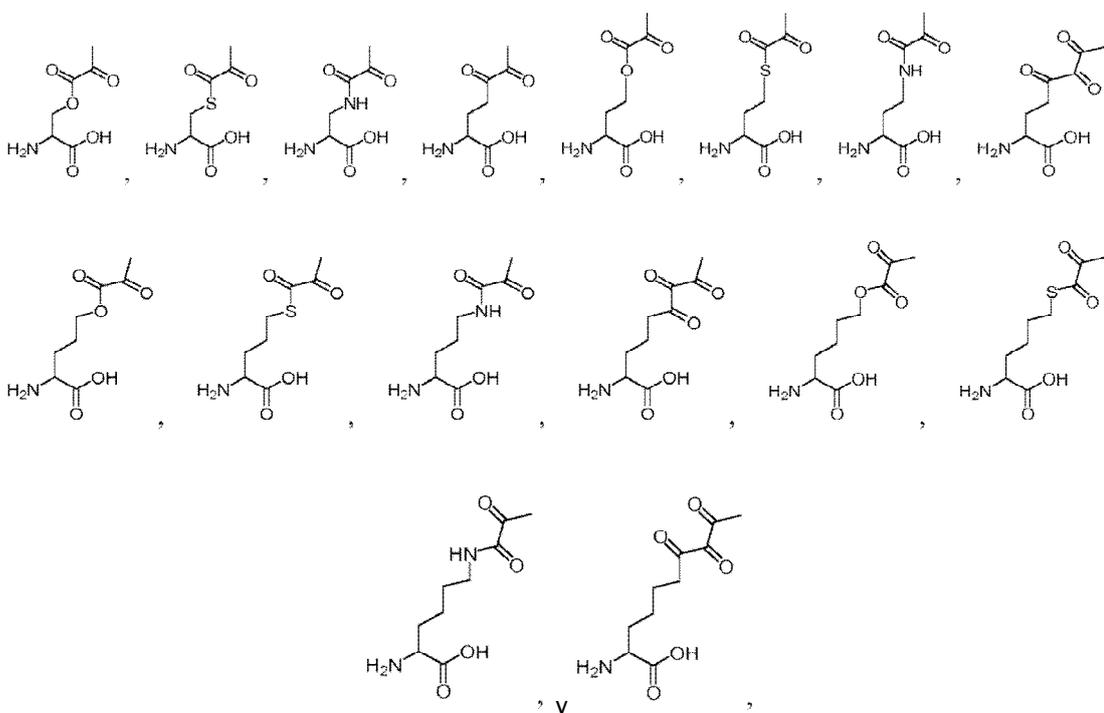
R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

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

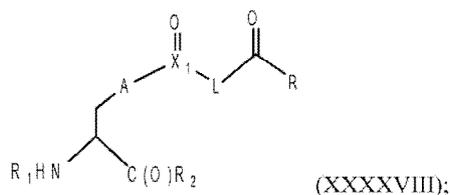
Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0219]** Además, se describen los siguientes aminoácidos:



en donde dichos compuestos están opcionalmente protegidos con amino y carboxilo, o una sal de los mismos, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y opcionalmente modificados postraduccionalmente.

**[0220]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXVIII):



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, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

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

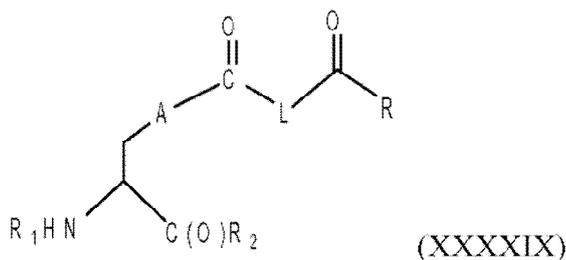
R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

X<sub>1</sub> es C, S o S(O); y L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0221]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXIX):



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, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

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

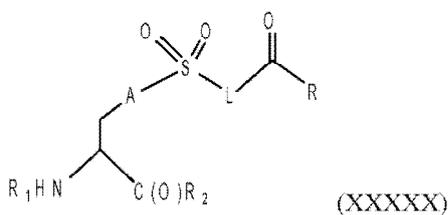
R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

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

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0222]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXX):



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;

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

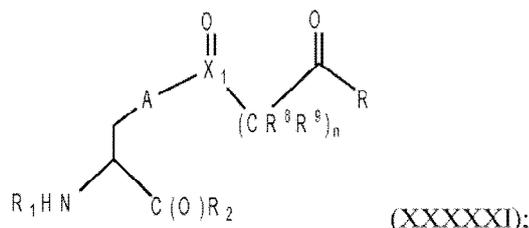
R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

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

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0223]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXI):



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;

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

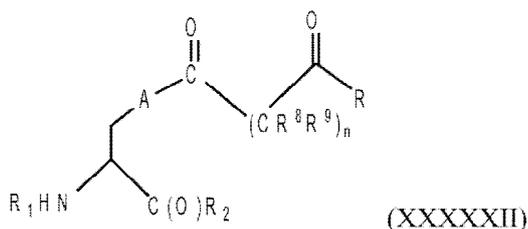
R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

X<sub>1</sub> es C, S o S(O); y n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> en cada grupo CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo o cualquier R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> pueden formar juntos = O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R<sup>8</sup> adyacentes puede juntos forman un cicloalquilo.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0224]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXII):



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;

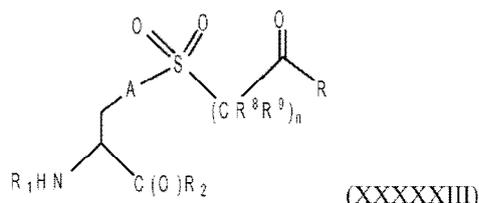
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

R<sub>2</sub> es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> en cada grupo CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo o cualquier R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R<sup>8</sup> adyacentes puede juntos forman un cicloalquilo.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0225]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXIII):



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;

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

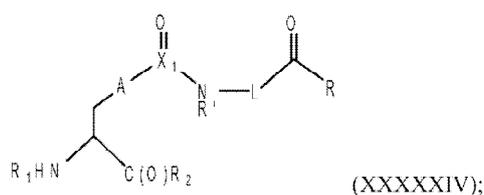
R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> en cada grupo CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo o cualquier R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R<sup>8</sup> adyacentes puede juntos forman un cicloalquilo.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0226]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXIV):



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, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

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

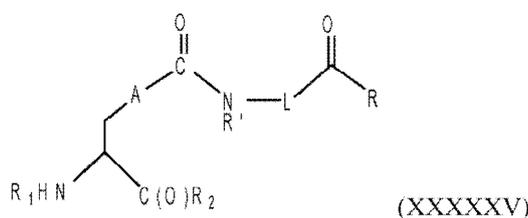
R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

X<sub>1</sub> es C, S o S(O); y L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0227]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXV):



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, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

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

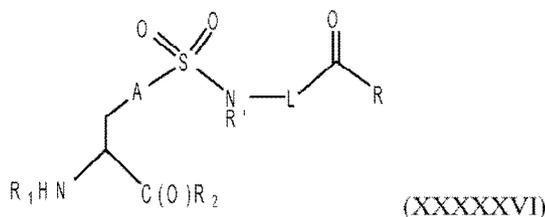
R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

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

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

**[0228]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXVI):



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, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

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

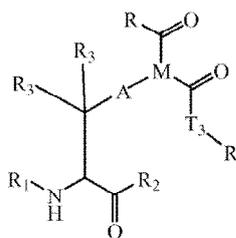
R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

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

5 Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

10 **[0229]** Además, se describen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXVII):

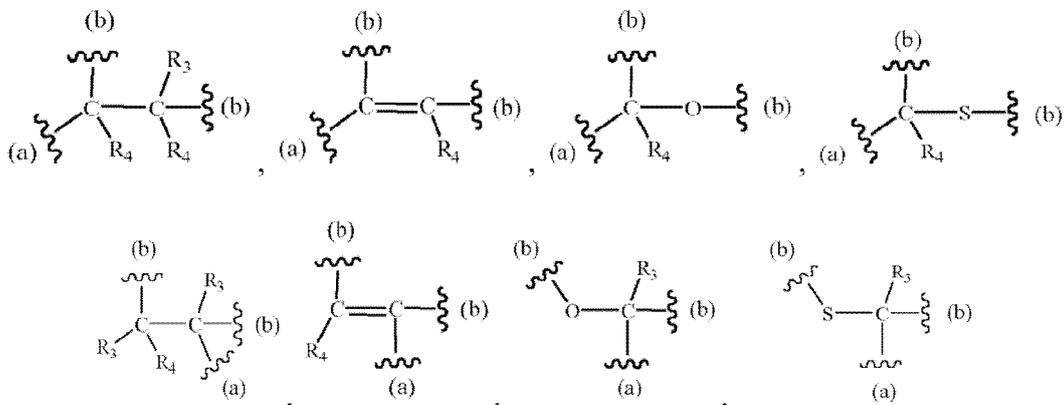


(XXXXXXVII),

en donde:

25 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;

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



50 en donde (a) indica unión al grupo A y (b) indica unión a respectivos grupos carbonilo, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se eligen independientemente de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> o dos R<sub>3</sub> grupos o dos grupos R<sub>4</sub> forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

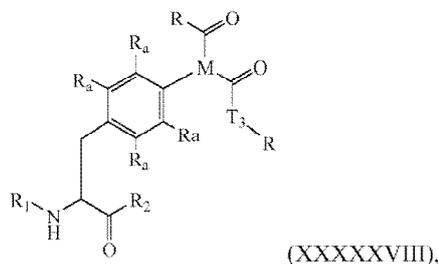
R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

T<sub>3</sub> es un enlace, C(R)(R), O o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

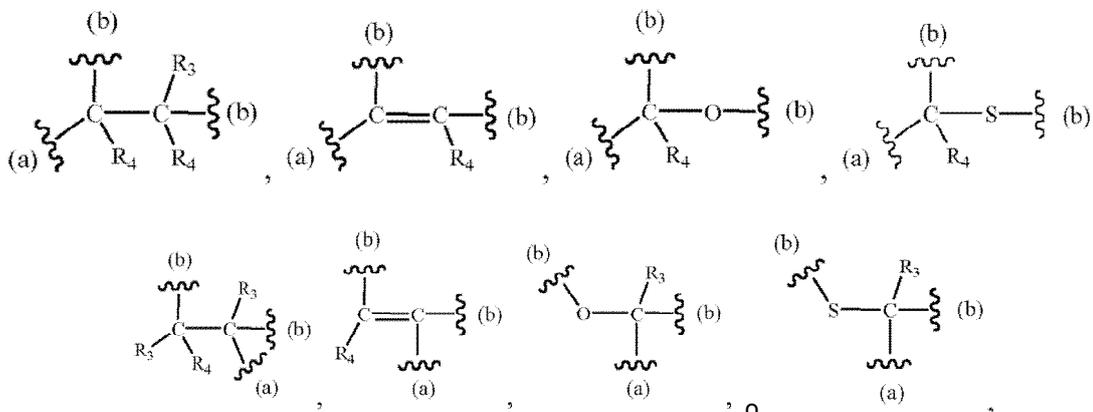
Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

60 **[0230]** Además, se describen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXVIII):



15 en donde:

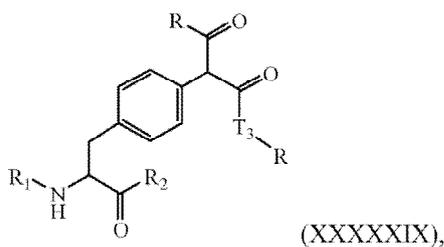
M es -C(R<sub>3</sub>)-,



40 en donde (a) indica unión al grupo A y (b) indica unión a respectivos grupos carbonilo, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se eligen independientemente de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> o dos grupos R<sub>3</sub> o dos grupos R<sub>4</sub> forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; T<sub>3</sub> es un enlace, C(R)(R), O o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R<sub>2</sub> es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada R<sub>a</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR', y -S(O)<sub>k</sub>R', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

50 Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

[0231] Además, se - los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXIX):

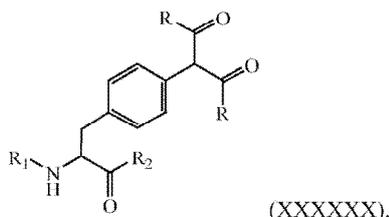


65 en donde:

R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; y  
T<sub>3</sub> es O, o S.

5 Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

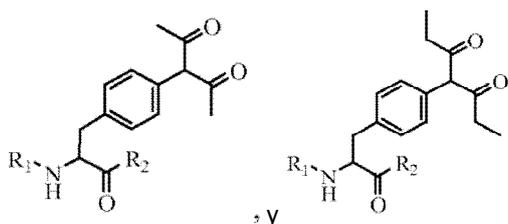
10 **[0232]** Además, se describen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXX):



en donde:

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

25 **[0233]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen estructuras de Fórmula (XXXXXX):



Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

40 **[0234]** La funcionalidad de carbonilo o dicarbonilo puede hacerse reaccionar selectivamente con un reactivo que contiene hidroxilamina en condiciones suaves en solución acuosa para formar el enlace de oxima correspondiente que es estable en condiciones fisiológicas. Véase, por ejemplo, Jencks, WP, J. Am. Chem. Soc. 81, 475 - 481 (1959); Shao, J. y Tam, JP, J. Am. Chem. Soc. 117 (14): 3893 - 3899 (1995). Además, la reactividad única del grupo carbonilo o dicarbonilo permite la modificación selectiva en presencia de otras cadenas laterales de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Cornish, VW, y col., J. Am. Chem. Soc. 118: 8150 - 8151 (1996); Geoghegan, KF y Stroh, JG, Bioconjug. Chem. 3: 138 - 146 (1992); Mahal, LK, y col., Science 276: 1125 - 1128 (1997).

50 **[0235]** La síntesis de p-acetilo-(+/-)-fenilalanina y m-acetilo-(+/-)-fenilalanina se describe en Zhang, Z., y col., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003). Otros aminoácidos que contienen carbonilo o dicarbonilo pueden prepararse de manera similar.

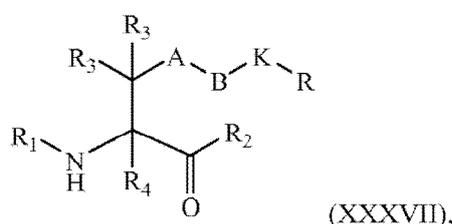
55 **[0236]** En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un aminoácido no natural se modifica químicamente para generar un grupo funcional carbonilo o dicarbonilo reactivo. Por ejemplo, se puede generar una funcionalidad aldehído útil para reacciones de conjugación a partir de una funcionalidad que tiene grupos amino e hidroxilo adyacentes. Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, por ejemplo, puede usarse una serina o treonina N-terminal (que puede estar normalmente presente o puede estar expuesta a través de digestión química o enzimática) para generar una funcionalidad aldehído bajo condiciones de escisión oxidativa suave que usan peryodato. Véase, por ejemplo, Gaertner, et. al., Bioconjug. Chem. 3: 262 - 268 (1992); Geoghegan, K. y Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3: 138 - 146 (1992); Gaertner y otros, J. Biol. Chem. 269: 7224 - 7230 (1994). Sin embargo, los métodos conocidos en la técnica están restringidos al aminoácido en el extremo N del péptido o proteína.

65 **[0237]** Adicionalmente, a modo de ejemplo, un aminoácido no natural que lleva grupos hidroxilo y amino adyacentes puede incorporarse en un polipéptido como una funcionalidad de aldehído "enmascarada". Por ejemplo, 5-hidroxilisina porta un grupo hidroxilo adyacente a la amina epsilon. Las condiciones de reacción para generar el aldehído implican típicamente la adición de exceso molar de metaperiodato de sodio en condiciones suaves para

evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación es típicamente de aproximadamente 7,0. Una reacción típica implica la adición de aproximadamente 1,5 molar de exceso de metaperyodato de sodio a una solución tamponada del polipéptido, seguido de incubación durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.423.685.

5 **B. Estructura y síntesis de aminoácidos no naturales: grupos de dicarbonilo, dicarbonilo, dicarbonilo enmascarado y dicarbonilo protegido**

10 **[0238]** Los aminoácidos con un grupo reactivo electrofílico permiten una variedad de reacciones para unir moléculas a través de reacciones de adición nucleófilas entre otras. Dichos grupos reactivos electrofílicos incluyen un grupo dicarbonilo (que incluye un grupo dicetona, un grupo cetoaldehído, un grupo cetoácido, un grupo cetoéster y un grupo ketotioéster), un grupo similar a dicarbonilo (que tiene una reactividad similar a un grupo dicarbonilo y es estructuralmente similar a un grupo dicarbonilo), un grupo dicarbonilo enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo dicarbonilo), o un grupo dicarbonilo protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo dicarbonilo tras la desprotección). Tales aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXVII):

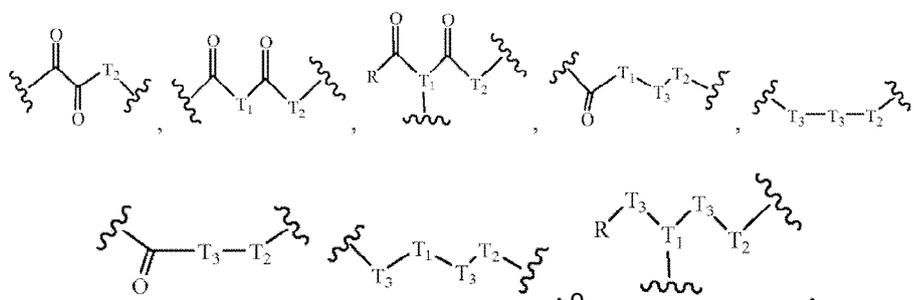


30 en donde:

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

35 B es opcional, y cuando está presente un enlazador unido en un extremo a un resto que contiene diamina, el enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)R"-, -S(O)<sub>k</sub>(alquileo o alquileo sustituido)-, donde k es 1, 2 o 3, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -NR"- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CON(R")-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R")-(alquileo o alquileo sustituido)- y -N(R")CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, donde cada R" es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

40 K es



60 en dónde,

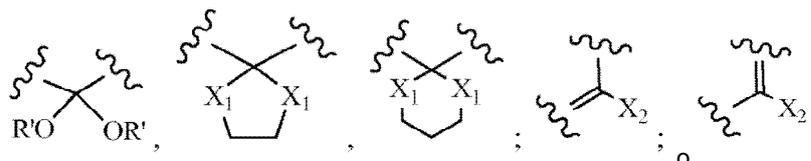
T<sub>1</sub> es un enlace, alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> opcionalmente sustituido, alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> opcionalmente sustituido o heteroalquilo opcionalmente sustituido;

65 en donde cada sustituyente opcional se selecciona independientemente de alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido,

alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

T<sub>2</sub>, se selecciona 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)<sub>k</sub>-donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N-, y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

T<sub>3</sub> es



donde cada X<sub>1</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en -O-, -S-, -N(H)-, -N(R)-, -N(Ac)- y -N(OMe)-;

X<sub>2</sub> es -OR, -OAc, -SR, -N(R)<sub>2</sub>, -N(R)(Ac), -N(R)(OMe) o N<sub>3</sub>, y donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

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

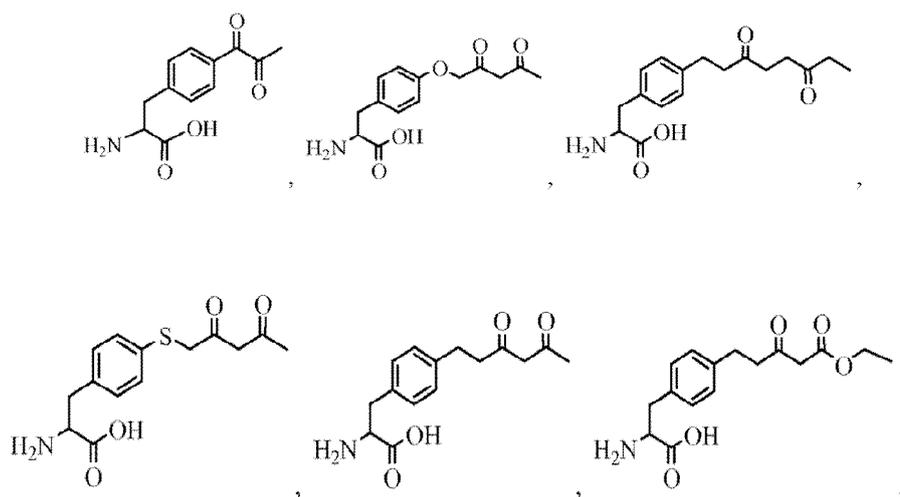
R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

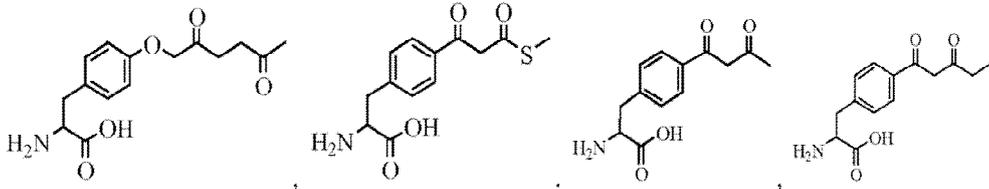
o los grupos -A-B-K-R forman juntos un cicloalquilo o heterocicloalquilo bicíclico o tricíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, que incluye un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, que incluye un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, que incluye un grupo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

o el grupo -K-R forma conjuntamente un cicloalquilo o heterocicloalquilo monocíclico o bicíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, que incluye un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, que incluye un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, que incluye un grupo dicarbonilo enmascarado.

**[0239]** Ejemplo no limitante de aminoácidos de dicarbonilo que tienen la estructura de fórmula (XXXVII) incluyen:

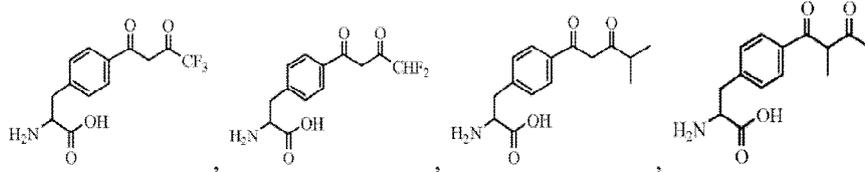


5



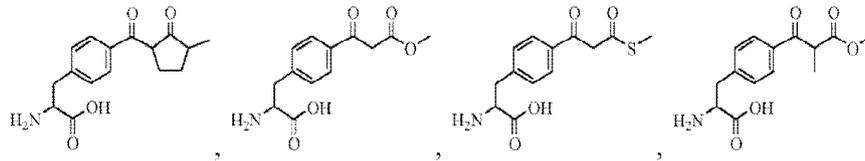
10

15



20

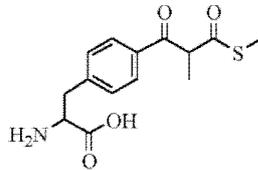
25



y

30

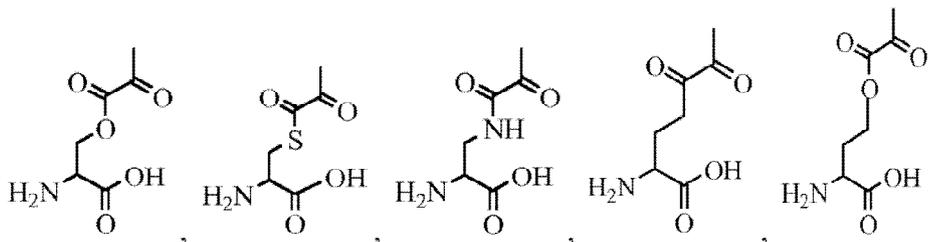
35



[0240] También se describen los siguientes aminoácidos que tienen estructuras de Fórmula (XXXVII):

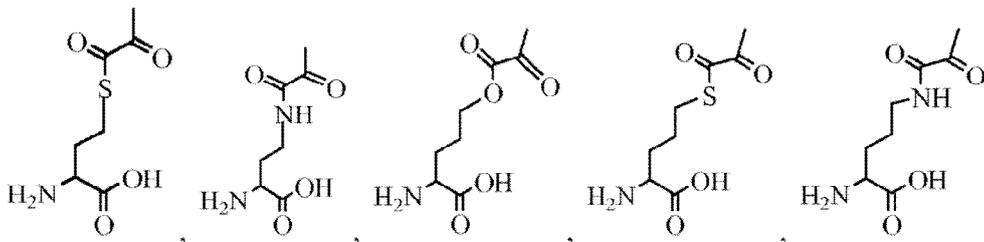
40

45

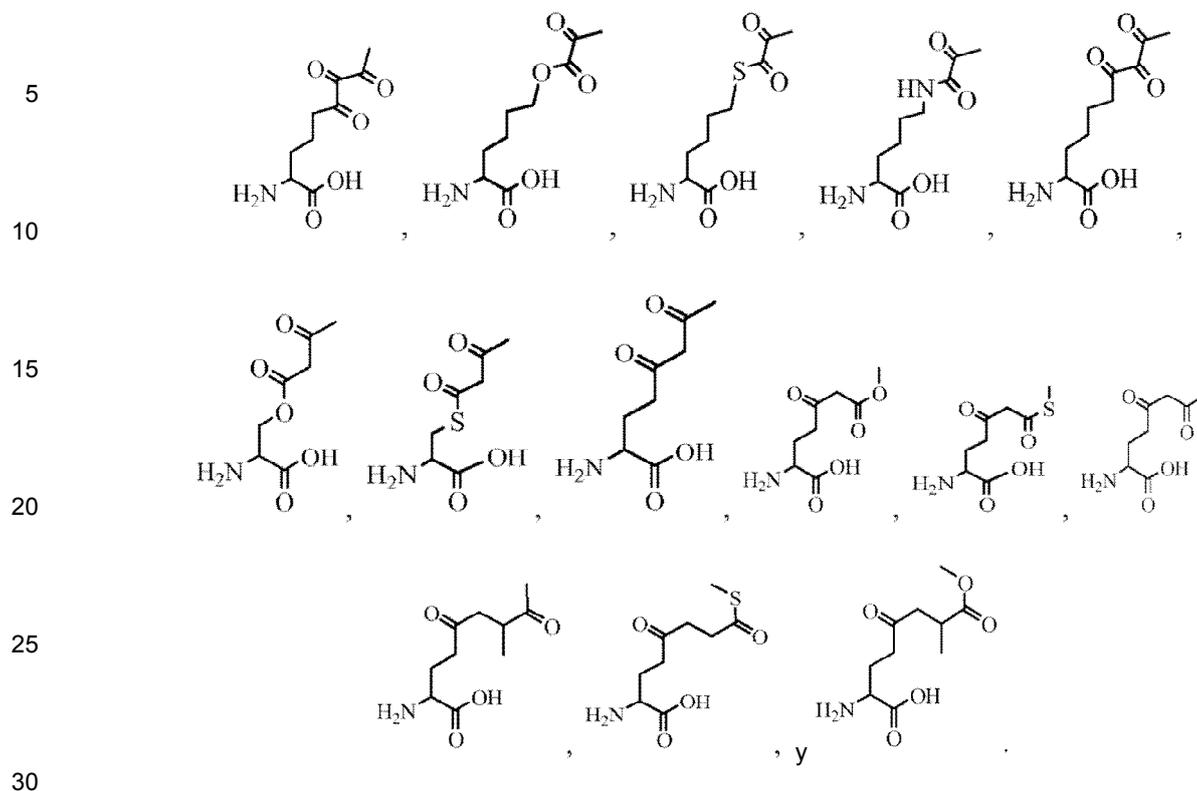


50

55



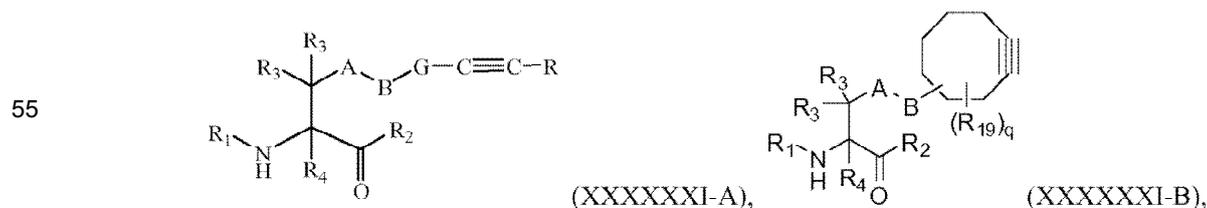
60



35 Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

40 **C. Estructura y Síntesis de Aminoácidos no Naturales: Cetoalquino, tipo Cetoalquino, Cetoalquino Enmascarado, Grupo Cetoalquino k Protegido, Alquino, y Grupos de Cicloalquino**

45 **[0241]** Los aminoácidos que contienen grupos reactivos con reactividad de tipo dicarbonilo permiten la unión de moléculas a través de reacciones de adición nucleofílicas. Dichos grupos reactivos electrófilos incluyen un grupo cetoalquino, un grupo similar al cetoalquino (que tiene una reactividad similar a un grupo cetoalquino y es estructuralmente similar a un grupo cetoalquino), un grupo cetoalquino enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo cetoalquino), o un grupo cetoalquino protegido (que tiene reactividad similar a un grupo cetoalquino después de la desprotección). En algunas divulgaciones, los aminoácidos que contienen grupos reactivos con un alquino terminal, alquino interno o cicloalquino permiten la unión de moléculas a través de reacciones de cicloadición (p. ej., cicloadiciones 1,3-dipolares, cicloadición de azida-alquino Huisgen, etc.). Tales aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXI-A) o (XXXXXXI-B):



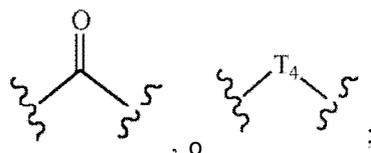
en donde:

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

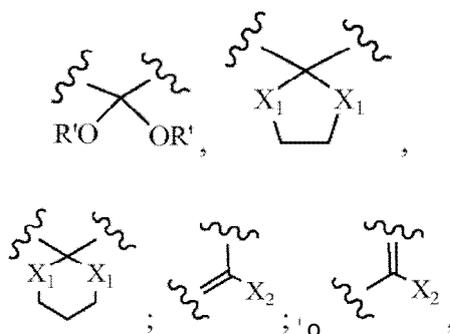
alquilenos sustituidos;

B es opcional, y cuando está presente un enlazador unido por un extremo a un resto que contiene diamina, el enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquilenos inferiores, alquilenos inferiores sustituidos, alquilenos inferiores, alquilenos inferiores sustituidos, heteroalquilenos inferiores, heteroalquilenos inferiores sustituidos, -O-(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, -S-(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, -C(O)R<sup>n</sup>-, -S(O)<sub>k</sub>(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, donde k es 1, 2 o 3, -C(O)-(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, -C(S)-(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, -NR<sup>n</sup>-(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, -CON(R<sup>n</sup>)-(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, -CSN(R<sup>n</sup>)-(alquilenos o alquilenos sustituidos)- y -N(R<sup>n</sup>)CO-(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, donde cada R<sup>n</sup> es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

G es opcional, y cuando está presente es



T<sub>4</sub> es un grupo protector de carbonilo que incluye, pero no se limita a,



donde cada X<sub>1</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en -O-, -S-, -N(H)-, -N(R)-, -N(Ac)- y -N(OMe)-; X<sub>2</sub> es -OR-, -OAc-, -SR-, -N(R)<sub>2</sub>-, -N(R)(Ac)-, -N(R)(OMe) o N<sub>3</sub>, y donde cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido;

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

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

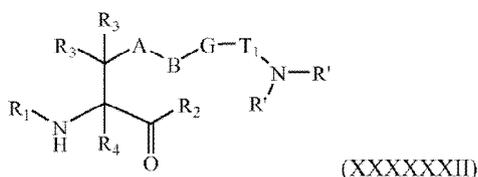
R<sub>2</sub> es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

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

cada R<sub>19</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alcoxi, éster, éter, tioéter, aminoalquilo, halógeno, éster alquílico, éster arílico, amida, arilamida, haluro de alquilo, alquilamina, ácido alquilsulfónico, alquilo nitro, tioéster, sulfonilo éster, halosulfonilo, nitrilo, alquilo nitrilo y nitro; y q es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11.

**D. Estructura y síntesis de aminoácidos no naturales: cetoamina, cetoamina, cetoamina enmascarada y grupos de cetoamina protegida**

[0242] Los aminoácidos que contienen grupos reactivos con reactividad similar a dicarbonilo permiten la unión de moléculas a través de reacciones de adición nucleofílicas. Dichos grupos reactivos incluyen un grupo de cetoamina, un grupo de tipo cetoamina (que tiene una reactividad similar a un grupo de cetoamina y es estructuralmente similar a un grupo de cetoamina), un grupo de cetoamina enmascarada (que puede convertirse fácilmente en un grupo de cetoamina), o grupo de cetoamina protegida (que tiene una reactividad similar a un grupo de cetoamina tras la desprotección). Dichos aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXII):



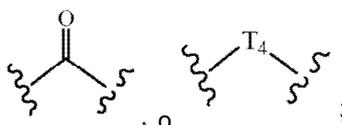
(XXXXXXII)

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;

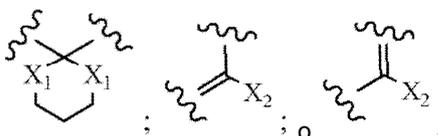
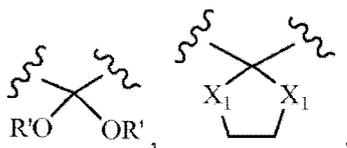
B es opcional, y cuando está presente un enlazador unido en un extremo a un resto que contiene diamina, el enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)R"-, -S(O)<sub>k</sub>(alquileo o alquileo sustituido)-, donde k es 1, 2 o 3, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -NR"- (alquileo o alquileo sustituido)-, -CON(R")-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R")-(alquileo o alquileo sustituido)- y -N(R")CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, donde cada R" es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

G es



T<sub>1</sub> es un C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquileo opcionalmente sustituido, un C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquenileno opcionalmente sustituido, o un heteroalquilo opcionalmente sustituido;

T<sub>4</sub> es un grupo protector de carbonilo que incluye, pero no se limita a,



donde cada X<sub>1</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en -O-, -S-, -N(H)-, -N(R')-, -N(Ac)- y -N(OMe)-;

X<sub>2</sub> es -OR, -OAc, -SR', -N(R')<sub>2</sub>, -N(R')(Ac), -N(R')(OMe) o N<sub>3</sub>, y donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

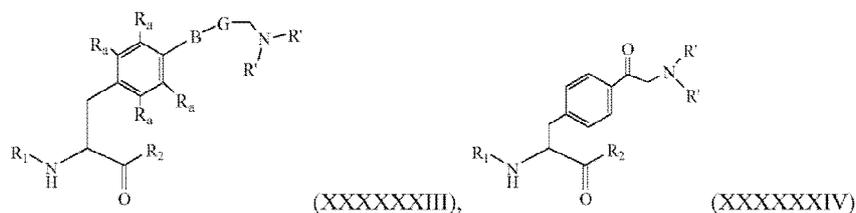
R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

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

[0243] Los aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XXXXXXII) incluyen aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XXXXXXIII) y fórmula (XXXXXXIV):



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

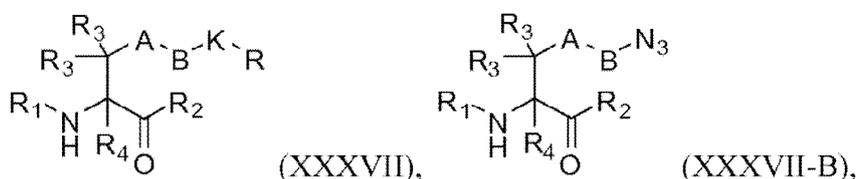
H, alquilo o alquilo sustituido.

**A. Estructura y Síntesis de Aminoácidos No Naturales: Diamina, Diamina, Diamina Enmascarada, Aminas Protegidas y Azidas**

[0244] Los aminoácidos con un grupo reactivo nucleofílico permiten una variedad de reacciones para unir moléculas mediante reacciones de adición electrofílica entre otras. Dichos grupos reactivos nucleófilos incluyen un grupo diamina (que incluye un grupo hidrazina, un grupo amidina, un grupo imina, un grupo 1,1-diamina, un grupo 1,2-diamina, un grupo 1,3-diamina y un grupo 1,4-diamina), un grupo similar a diamina (que tiene una reactividad similar a un grupo diamina y es estructuralmente similar a un grupo diamina), un grupo diamina enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo diamina), o un grupo de diamina protegida (que tiene una reactividad similar a un grupo diamina después de la desprotección). En algunas divulgaciones, los aminoácidos que contienen grupos reactivos con azidas permiten la unión de moléculas a través de reacciones de cicloadición (por ejemplo, cicloadiciones 1,3-dipolares, cicloadición de azida-alquino Huisgen, etc.).

[0245] En otro aspecto hay métodos para la síntesis química de moléculas sustituidas con hidrazina para la derivatización de derivados de dolastatina sustituidos con carbonilo. En una descripción, la molécula sustituida con hidracina puede derivar derivados unidos a dolastatina. En una descripción, son métodos para la preparación de moléculas sustituidas con hidrazina adecuadas para la derivatización de polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo, incluyendo, a modo de ejemplo solamente, polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen cetona o aldehído. En una descripción adicional, los aminoácidos no naturales se incorporan en el sitio específico durante la traducción *in vivo* de las proteínas. En una descripción adicional, los derivados de dolastatina sustituidos con hidrazina permiten la derivatización específica de sitio de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo a través del ataque nucleofílico de cada grupo carbonilo para formar un polipéptido derivado de heterociclo, que incluye un polipéptido derivado de heterociclo que contiene nitrógeno de un sitio específico. En una descripción adicional, el método para la preparación de derivados de dolastatina sustituidos con hidrazina proporciona acceso a una amplia variedad de polipéptidos derivatizados específicamente de sitio. En una descripción adicional, se describen métodos para sintetizar derivados de dolastatina unidos a polietilenglicol (PEG) hidrazinados.

[0246] Dichos aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXVII-A) o (XXXVII-B):

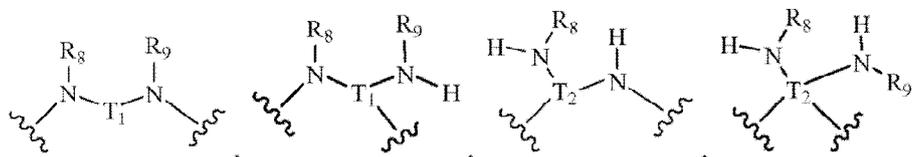


en donde:

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 un enlazador unido en un extremo a un resto que contiene diamina, el enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)R"-, -C(O)R"-, -S(O)<sub>k</sub>(alquileno o alquileno sustituido)-, donde k es 1, 2 o 3, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -NR"-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CON(R")-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R")-(alquileno o alquileno sustituido)- y -N(R")CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, donde cada R" es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

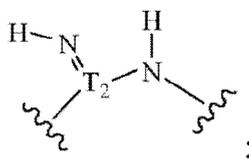
K es



o

5

10



15

dónde:

R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> se seleccionan independientemente de H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido o grupo protector de aminas;  
 T<sub>1</sub> es un enlace, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquilenlo opcionalmente sustituido, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquenileno opcionalmente sustituido, o heteroalquilo opcionalmente sustituido;  
 T<sub>2</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquilenlo opcionalmente sustituido, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquenileno opcionalmente sustituido, heteroalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido;  
 en donde cada sustituyente opcional se selecciona independientemente entre alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo inferior, cicloalquilo inferior sustituido, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido, alquinilo, heteroalquilo inferior, heteroalquilo sustituido, heterocicloalquilo inferior, heterocicloalquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido;

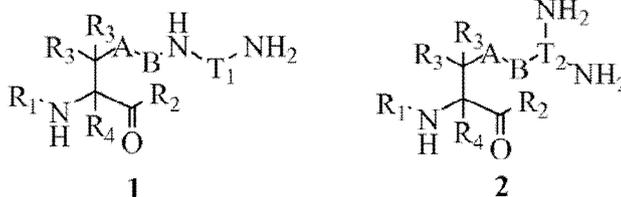
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;  
 R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y  
 R<sub>2</sub> es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;  
 cada uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> dos grupos R<sub>3</sub> forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

o los grupos -A-B-K-R juntos forman un cicloalquilo o heterocicloalquilo bicíclico o tricíclico que comprende al menos un grupo diamina, un grupo diamina protegido o un grupo diamina enmascarado;  
 o los grupos -B-K-R juntos forman un cicloalquilo o cicloarilo o heterocicloalquilo bicíclico o tricíclico que comprende al menos un grupo diamina, un grupo diamina protegido o un grupo diamina enmascarado;  
 o el grupo -K-R forma conjuntamente un cicloalquilo o heterocicloalquilo monocíclico o bicíclico que comprende al menos un grupo diamina, un grupo diamina protegido o un grupo diamina enmascarado;

en donde al menos un grupo amina en -A-B-K-R es opcionalmente una amina protegida.

[0247] En un aspecto, son compuestos que comprenden las estructuras 1 o 2:

50



55

en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquilenlo inferior, alquilenlo inferior sustituido, cicloalquilenlo inferior, cicloalquilenlo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquilenlo inferior, heteroalquilenlo sustituido, heterocicloalquilenlo inferior, heterocicloalquilenlo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquilenlo o aralquilenlo sustituido;  
 B es opcional, y cuando está presente es un enlazador unido en un extremo a un resto que contiene diamina, el enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquilenlo inferior, alquilenlo inferior sustituido, alquenileno

inferior, alqueni-  
 5 inferior sustituido, heteroalqueni-  
 inferior sustituido, -O-(alqueni-  
 o alqueni-  
 sustituido)-, -S-(alqueni-  
 o alqueni-  
 sustituido)-, -C(O)R"-, - S(O)<sub>k</sub>(alqueni-  
 o alqueni-  
 sustituido)-, donde k es 1, 2 o 3, -C(O)-(alqueni-  
 o alqueni-  
 sustituido)-, -C(S)-(alqueni-  
 o alqueni-  
 sustituido)-, -NR"-  
 (alqueni-  
 o alqueni-  
 sustituido)-, -CON(R")-(alqueni-  
 o alqueni-  
 sustituido)-, -CSN(R")-(alqueni-  
 o alqueni-  
 sustituido)- y -N(R")CO-(alqueni-  
 o alqueni-  
 sustituido)-, donde cada R" es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

T<sub>1</sub> es un enlace o CH<sub>2</sub>; y T<sub>2</sub> es CH;

en el que cada sustituyente opcional se selecciona independientemente de alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo inferior, cicloalquilo inferior sustituido, alqueni-  
 10 inferior, alqueni-  
 inferior sustituido, alqueni-  
 inferior, heteroalquilo inferior, heteroalquilo sustituido, heterocicloalquilo inferior, heterocicloalquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido;

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

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

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

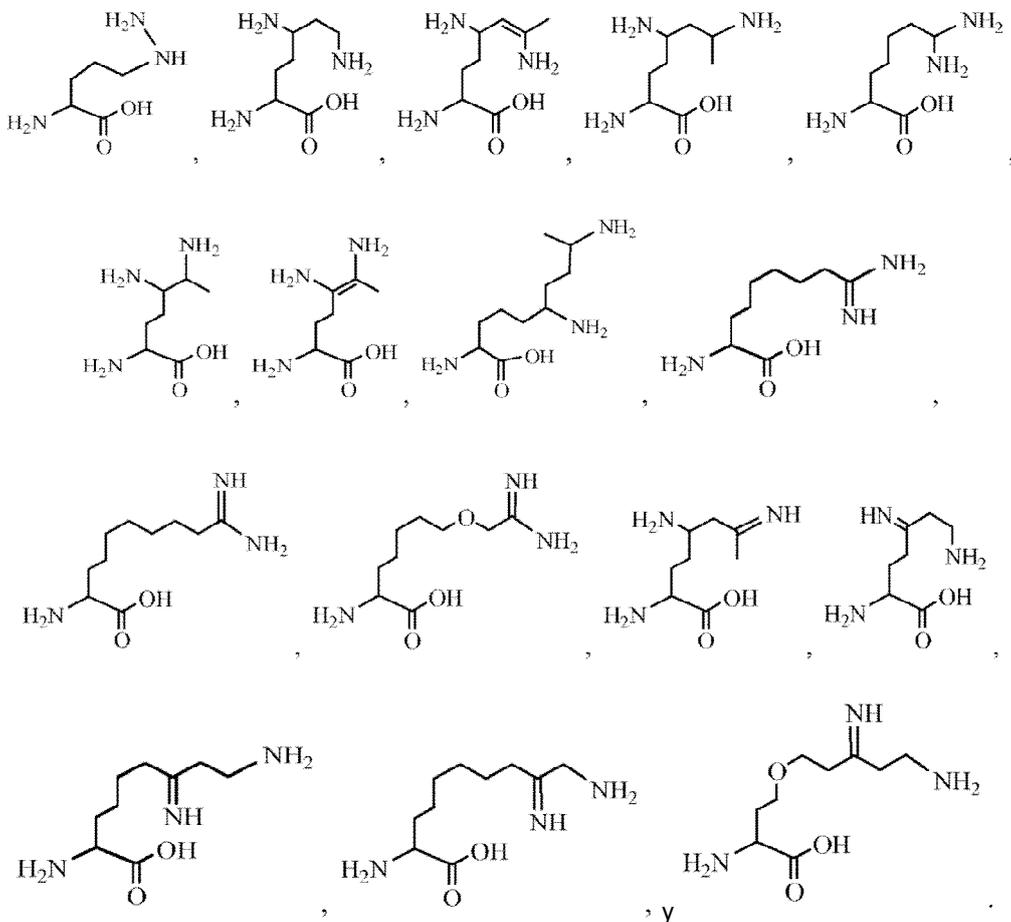
o el resto que contiene -AB-diamina juntos forma un cicloalquilo o heterocicloalquilo bicíclico que comprende al menos un grupo diamina, un grupo diamina protegido o un grupo diamina enmascarado;

20 o los grupos restos que contienen -B-diamina forman juntos un cicloalquilo o cicloalquilo o ciclohexilo tricíclico o heterocíclico que comprende al menos un grupo diamina, un grupo diamina protegido o un grupo diamina enmascarado;

en donde al menos un grupo amina en un resto que contiene -A-B-diamina es opcionalmente una amina protegida;

o un metabolito activo, sal, o un profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 **[0248]** Se describen los siguientes ejemplos no limitantes de aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXVII):



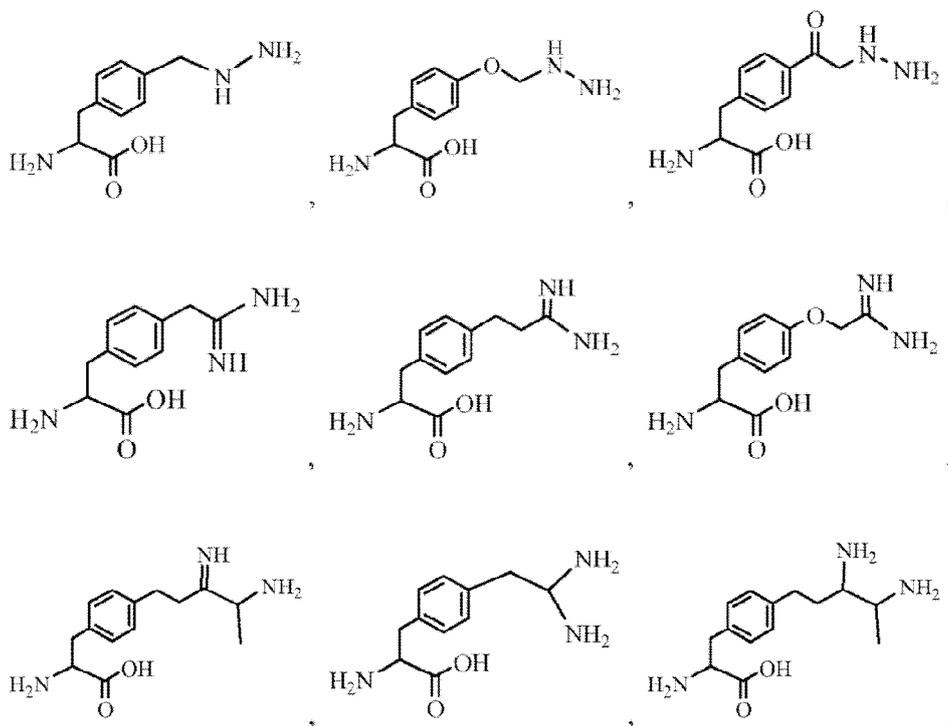
Dichos aminoácidos no naturales también pueden estar en forma de una sal o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y/u opcionalmente modificado

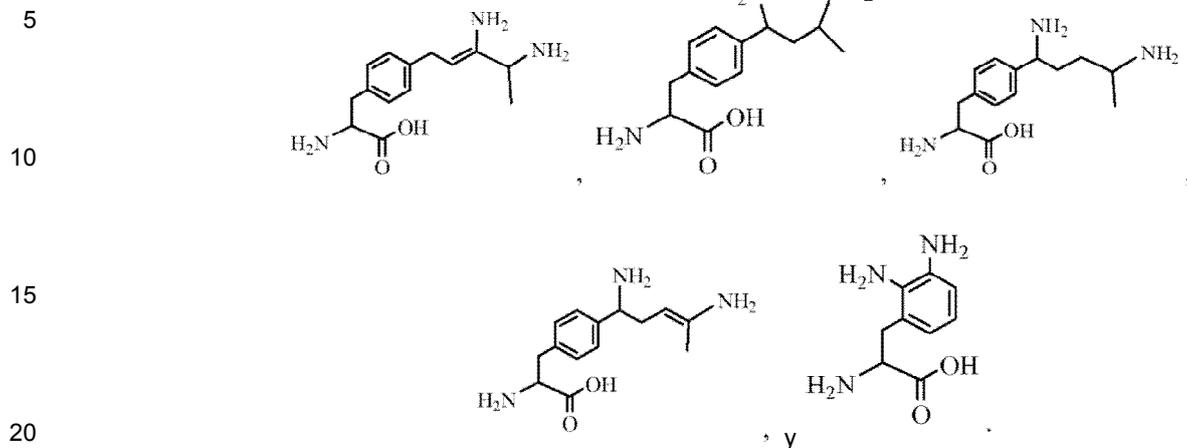
postraduccionalmente.

**[0249]** En ciertas divulgaciones, los compuestos de Fórmula (XXXVII) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas divulgaciones, los compuestos de Fórmula (XXXVII) son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas divulgaciones, los compuestos de Fórmula (XXXVII) son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas divulgaciones, tales condiciones ácidas son pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 8.

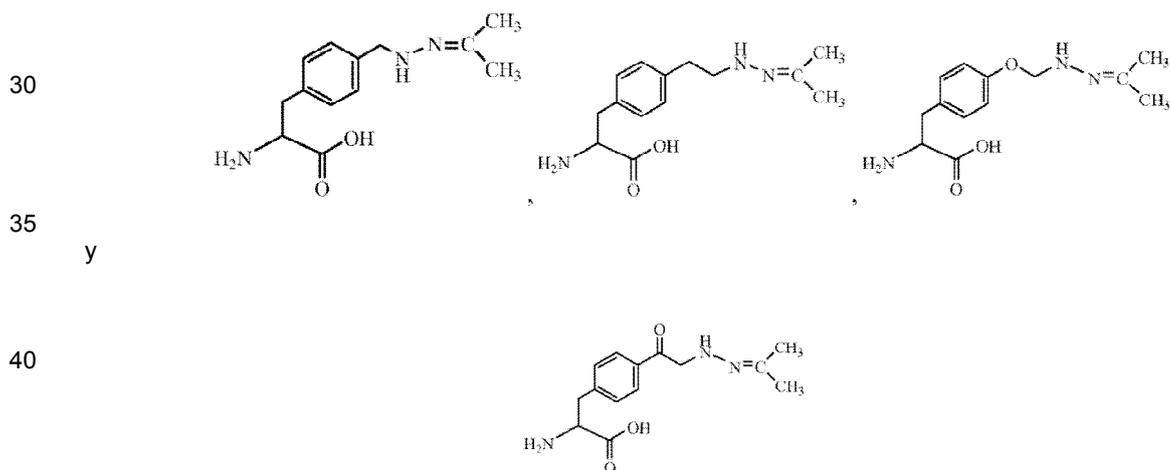
**[0250]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), B es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, O-(alquileo o alquileo sustituido)-, C (R')=N-N(R')-, -N(R')CO-, C(O)-, -C(R')=N-, C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, CON(R') (alquileo o alquileo sustituido)-, -S(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)(alquileo o alquileo sustituido)- o -S(O)<sub>2</sub> (alquileo o alquileo sustituido)-. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (XXXVII), B es -O(CH<sub>2</sub>)-, -CH=N-, CH=NNH-, -NHCH<sub>2</sub>-, -NHCO-, C(O)-, C(O)(CH<sub>2</sub>)-, CONH(CH<sub>2</sub>)-, -SCH<sub>2</sub>-, -S(=O)CH<sub>2</sub>-, o -S(O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII) R es alquilo C<sub>1-6</sub> o cicloalquilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R<sub>1</sub> es H, terc-butiloxicarbonilo (Boc), 9-Fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), N-acetilo, tetrafluoroacetilo (TFA) o benciloxicarbonilo (Cbz). En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R<sub>1</sub> es una resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R<sub>2</sub> es OH, O-metilo, O-etilo u O-t-butilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R<sub>2</sub> es una resina, al menos un aminoácido, polipéptido o polinucleótido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R<sub>2</sub> es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o anticuerpo monoclonal.

**[0251]** También se describen los siguientes ejemplos no limitantes de aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXVII):





25 **[0252]** Ejemplos no limitantes de aminoácidos protegidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXVII) incluyen:



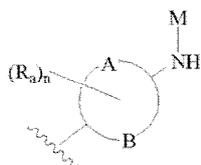
**F. Estructura y síntesis de aminoácidos no naturales: aminas aromáticas**

50 **[0253]** Aminoácidos no naturales con grupos reactivos nucleofílicos, tales como, solo a modo de ejemplo, un grupo amino aromático (que incluye grupos amina secundaria y terciaria), un grupo amina aromático enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo amina aromático), o un grupo amina aromático protegido (que tiene reactividad similar a un grupo amino aromático tras la desprotección) permite una variedad de reacciones para unir moléculas a través de diversas reacciones, que incluyen, pero no se limitan a, reacciones de alquilación reductiva con derivados de enlazador de dolastatina que contienen aldehído. Dichos aminoácidos no naturales que contienen aminas aromáticas incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXV):



en donde:

5



10 se selecciona del grupo que consiste en un anillo de arilo monocíclico, un anillo de arilo bicíclico, un anillo de arilo multicíclico, un anillo de heteroarilo monocíclico, un anillo de heteroarilo bicíclico y un anillo de heteroarilo multicíclico;

A es independientemente CR<sub>a</sub>, o N;

B es independientemente CR<sub>a</sub>, N, O o S;

15 cada R<sub>a</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, -NO<sub>2</sub>, -CN, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR', y -S(O)<sub>k</sub>R', donde k es 1, 2 o 3; y n es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

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

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

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

M es H o -CH<sub>2</sub>R<sub>5</sub>; o el resto MNC (R<sub>5</sub>) puede formar una estructura de anillo de 4 a 7 miembros;

25 R<sub>5</sub> es alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialqueno, óxido de polialqueno sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido,

30 alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, -C(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)N(R'')<sub>2</sub>, -C(O)NHCH(R'')<sub>2</sub>, -(alqueno o alqueno sustituido)-N(R'')<sub>2</sub>, -(alqueno o alqueno sustituido)-N(R'')<sub>2</sub>, -(alqueno o alqueno sustituido)-(arilo o arilo sustituido), -(alqueno o alqueno sustituido)-(arilo o arilo sustituido), -(alqueno o alqueno sustituido)-ON(R'')<sub>2</sub>, -(alqueno o alqueno sustituido)-C(O)SR'', -(alqueno o alqueno sustituido)-SS-

35 (arilo o arilo sustituido), donde cada R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo y, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido o -C(O)OR';

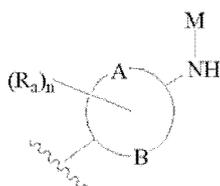
o dos grupos R<sub>5</sub> forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

o R<sub>5</sub> y cualquier R<sub>a</sub> forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; y cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

35 Dichos aminoácidos no naturales también pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y opcionalmente reductivamente alquilado.

La estructura

40

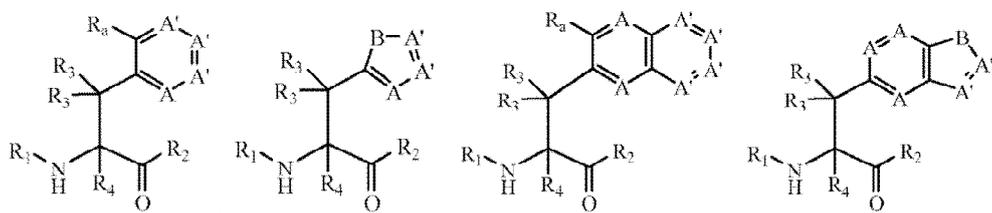


45

50 (como se presenta en todos los ejemplos del presente documento) no presenta las orientaciones relativas de "A", "B", "NH-M" y "Ra"; más bien, estas cuatro características de esta estructura pueden estar orientadas de cualquier manera químicamente sana (junto con otras características de esta estructura), como se ilustra por el ejemplo en este documento.

55 **[0254]** Los aminoácidos no naturales que contienen un resto de amina aromática que tiene la estructura de Fórmula (A) incluyen aminoácidos no naturales que tienen las estructuras:

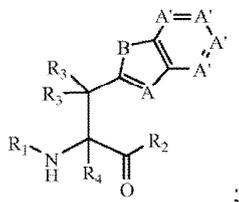
60



65

y

5



10

en donde cada A' se selecciona independientemente de CR<sub>a</sub>, N o

15



20

y hasta dos A' pueden ser

25



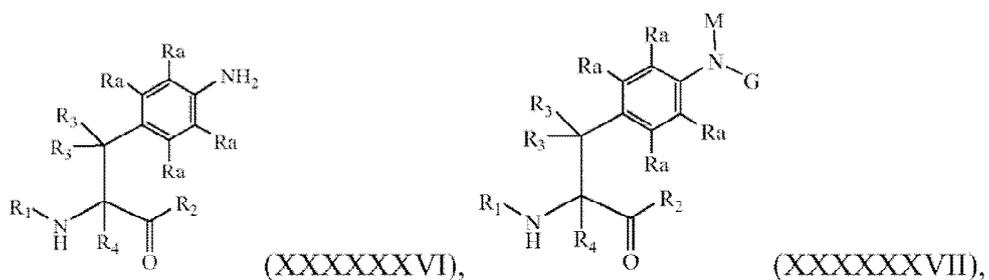
30

seleccionándose el A' restante de CR<sub>a</sub>, o N. Dichos aminoácidos no naturales también pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y opcionalmente reductivamente alquilado.

35

**[0255]** Ejemplos no limitantes de aminoácidos no naturales que contienen un resto de amina aromática que tiene la estructura de Fórmula (XXXXXXV) incluyen aminoácidos no naturales que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXVI) y Fórmula (XXXXXXVII),

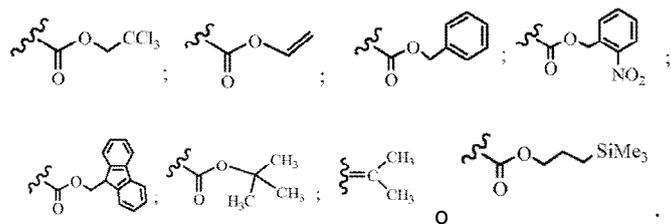
40



45

en donde; G es un grupo protector de aminas, que incluye, entre otros,

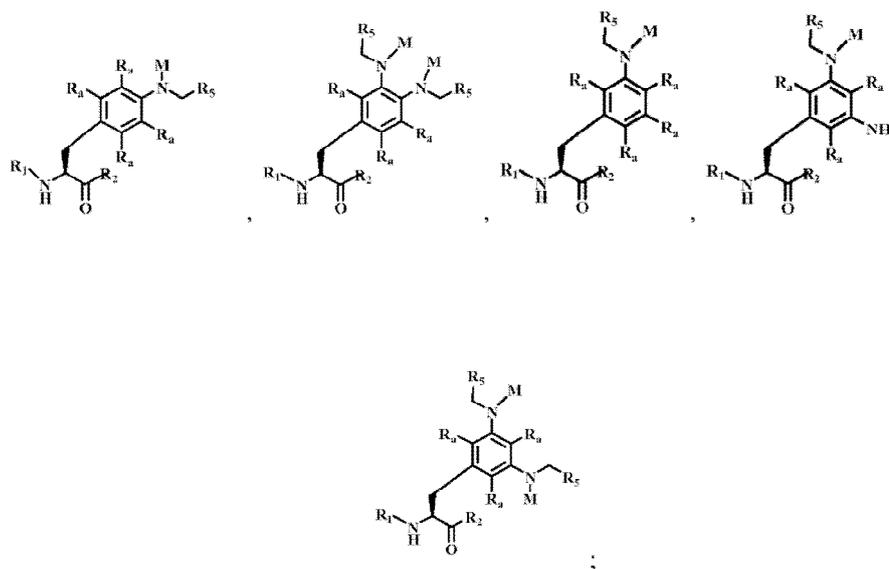
55



60

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y opcionalmente reductivamente alquilado.

**[0256]** Los aminoácidos no naturales que contienen un resto de amina aromática tienen las siguientes estructuras:



en donde cada  $R_a$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CN}$ , alquilo sustituido,  $-\text{N}(\text{R}')_2$ ,  $-\text{C}(\text{O})_k\text{R}'$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ ,  $-\text{OR}'$ , y  $-\text{S}(\text{O})_k\text{R}'$ , donde  $k$  es 1, 2 o 3;

$M$  es H o  $-\text{CH}_2\text{R}_5$ ; o el resto MNC ( $\text{R}_5$ ) puede formar una estructura de anillo de 4 a 7 miembros;

$\text{R}_1$  es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

$\text{R}_2$  es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

$\text{R}_5$  es alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialquilenilo, óxido de polialquilenilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}''$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}''$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}'')_2$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}(\text{R}'')_2$ ,  $-(\text{alquilenilo o alquilenilo sustituido})-\text{N}(\text{R}'')_2$ ,  $-(\text{alquenilenilo o alquenilenilo sustituido})-\text{N}(\text{R}'')_2$ ,  $-(\text{alquilenilo o alquilenilo sustituido})-(\text{arilo o arilo sustituido})$ ,  $-(\text{alquenilenilo o alquenilenilo sustituido})-(\text{arilo o arilo sustituido})$ ,  $-(\text{alquilenilo o alquilenilo sustituido})-\text{ON}(\text{R}'')_2$ ,  $-(\text{alquilenilo o alquilenilo sustituido})-\text{C}(\text{O})\text{SR}''$ ,  $-(\text{alquilenilo o alquilenilo sustituido})-\text{S}-\text{S}-(\text{arilo o arilo sustituido})$ , donde cada  $\text{R}''$  es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido o  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ ;

o  $\text{R}_5$  y cualquier  $\text{R}_a$  forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; y

cada  $\text{R}'$  es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales también pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural.

**[0257]** Dichos aminoácidos no naturales de Fórmula (XXXXXXV) pueden formarse por reducción de restos amina protegidos o enmascarados en el resto aromático de un aminoácido no natural. Dichos restos de amina protegidos o enmascarados incluyen, pero sin limitación, sustituyentes de iminas, hidrazinas, nitro o azida. Los agentes reductores usados para reducir dichos restos amina protegidos o enmascarados incluyen, pero sin limitación, TCEP,  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ,  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{NaBH}_4$  o  $\text{NaBCNH}_3$ .

#### IV. Derivados de dolastatina enlazados a aminoácidos no naturales

**[0258]** En otro aspecto descrito en la presente memoria, se describen métodos, estrategias y técnicas para incorporar al menos uno de dichos derivados de enlazador de dolastatina a un aminoácido no natural. También se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar tales derivados de enlazador de dolastatina que contienen al menos uno de tales aminoácidos no naturales. También se incluyen con este aspecto composiciones y métodos para producir, purificar, caracterizar y usar oligonucleótidos (que incluyen ADN y ARN) que se pueden usar para producir, al menos en parte, un derivado enlazador de dolastatina que contiene al menos un aminoácido no natural. También se incluyen con este aspecto composiciones y métodos para producir, purificar, caracterizar y usar células que pueden expresar dichos oligonucleótidos que pueden usarse para producir, al menos en parte, un derivado enlazador de dolastatina que contiene al menos un aminoácido no natural.

**[0259]** Por lo tanto, se proporcionan y describen en la presente los derivados del enlazador de dolastatina que comprenden al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con un grupo carbonilo, dicarbonilo, alquino, cicloalquino, azida, oxima o hidroxilamina. En ciertas divulgaciones, los derivados del enlazador de dolastatina con al menos un aminoácido no natural o un aminoácido modificado no natural con un grupo carbonilo, dicarbonilo, alquino, cicloalquino, azida, oxima o hidroxilamina incluyen al menos una modificación

postraducciona en alguna posición sobre el polipéptido. En algunas divulgaciones, la modificación co-traducciona o postraducciona ocurre a través de la maquinaria celular (por ejemplo, glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación de enlace de glicolípidos, y similares), en muchas instancias, tales modificaciones co-traduccionales o postraduccionales basadas en la maquinaria celular ocurren en los sitios de aminoácidos que ocurren naturalmente en el polipéptido, sin embargo, en ciertas realizaciones, las modificaciones co-traduccionales o post-traduccionales basadas en maquinaria celular se producen en el (los) sitio(s) de aminoácidos no naturales en el polipéptido.

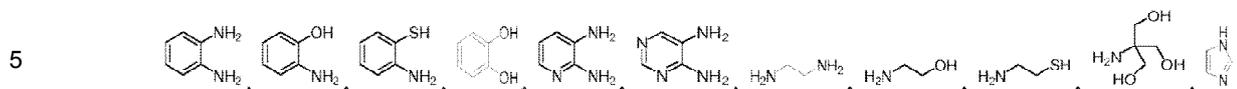
**[0260]** En otras descripciones, la modificación postraducciona no utiliza la maquinaria celular, pero la funcionalidad se proporciona en cambio mediante la unión de una molécula (un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado de polietilenglicol, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y cualquier combinación de los mismos) que comprende un segundo grupo reactivo a al menos un aminoácido no natural que comprende un primer grupo reactivo (que incluye, pero no se limita a aminoácidos no naturales que contienen un grupo funcional cetona, aldehído, acetal, hemiacetal, alquino, cicloalcano, azida, oxima o hidroxilamina) utilizando la metodología química descrita en la presente memoria u otras adecuadas para los grupos reactivos particulares. En ciertas divulgaciones, la modificación co-traducciona o postraducciona se realiza *in vivo* en una célula eucariótica o en una célula no eucariótica. En ciertas divulgaciones, la modificación postraducciona se realiza *in vitro* sin utilizar la maquinaria celular. También se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar tales derivados de enlazador de dolastatina que contienen al menos uno de tales aminoácidos no naturales modificados de forma co-traducciona o postraducciona.

**[0261]** También se incluyen dentro del alcance de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en este documento reactivos capaces de reaccionar con un derivado enlazador de dolastatina (que contiene un grupo carbonilo o dicarbonilo, grupo oxima, alquino, cicloalquino, azida, grupo hidroxilamina, o formas enmascaradas o protegidas de los mismos) que es parte de un polipéptido para producir cualquiera de las modificaciones postraduccionales antes mencionadas. En ciertas divulgaciones, el derivado enlazador de dolastatina modificado postraduccionalmente contendrá al menos un grupo oxima; el derivado enlazador de dolastatina que contiene oxima modificada resultante puede experimentar reacciones de modificación posteriores. También se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar tales reactivos que son capaces de cualquiera de tales modificaciones postraduccionales de dicho(s) derivado(s) de enlazador de dolastatina.

**[0262]** En ciertas divulgaciones, el polipéptido o derivado de dolastatina unido a aminoácidos no naturales incluye al menos una modificación co-traducciona o postraducciona que se realiza *in vivo* por una célula huésped, donde la modificación postraducciona no se realiza normalmente. por otro tipo de célula huésped. En ciertas realizaciones, el polipéptido incluye al menos una modificación co-traducciona o postraducciona que se realiza *in vivo* por una célula eucariótica, donde la modificación de la traducción simultánea o postraducciona no se realiza normalmente por una célula no eucariótica. Los ejemplos de tales modificaciones co-traduccionales o postraduccionales incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación del enlace de glicolípidos y similares. En una descripción, la modificación co-traducciona o postraducciona comprende la unión de un oligosacárido a una asparagina por un enlace GlcNAc-asparagina (que incluye, aunque sin limitación, el oligosacárido que comprende (GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAc, y similares). En otra realización, la modificación co-traducciona o postraducciona comprende la unión de un oligosacárido (que incluye, pero no se limita a, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina por una GalNAc-serina, una GalNAc-treonina, una GlcNAc-serina o un enlace GlcNAc-treonina. En ciertas divulgaciones, una proteína o polipéptido puede comprender una secuencia de secreción o localización, una etiqueta de epítipo, una etiqueta de FLAG, una etiqueta de polihistidina, una fusión de GST y/o similares. También se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar dichos polipéptidos que contienen al menos una de tales modificaciones co-traduccionales o postraduccionales. En otras descripciones, el polipéptido de aminoácido no natural glicosilado se produce en una forma no glicosilada. Dicha forma no glicosilada de un aminoácido no natural glicosilado puede producirse mediante métodos que incluyen la eliminación química o enzimática de grupos oligosacáridos de un polipéptido de aminoácido no natural glicosilado aislado o sustancialmente purificado o no purificado; producción del aminoácido no natural en un huésped que no glicosila dicho polipéptido de aminoácido no natural (tal como un huésped que incluye procariontas o eucariotas modificados genéticamente o mutados para no glicosilar tal polipéptido), la introducción de un inhibidor de glicosilación en el medio de cultivo celular en el que un polipéptido de aminoácido no natural está siendo producido por un eucarionte que normalmente glicosilaría tal polipéptido, o una combinación de cualquiera de tales métodos. También se describen en el presente documento tales formas no glicosiladas de polipéptidos de aminoácidos no naturales normalmente glicosilados (por normalmente glicosilado se quiere decir un polipéptido que se glicosilaría cuando se produce en condiciones en las que los polipéptidos de origen natural están glicosilados). Por supuesto, tales formas no glicosiladas de polipéptidos de aminoácidos no naturales normalmente glicosilados (o de hecho cualquier polipéptido descrito en este documento) pueden estar en una forma no purificada, una forma sustancialmente purificada, o en una forma aislada.

**[0263]** En ciertas divulgaciones, el polipéptido de aminoácido no natural incluye al menos una modificación postraducciona que se realiza en presencia de un acelerador, en el que la modificación postraducciona es estequiométrica, de tipo estequiométrico o casi estequiométrico. En otras realizaciones, el polipéptido se pone en contacto con un reactivo de Fórmula (XIX) en presencia de un acelerante. En otras realizaciones, el acelerante se

selecciona del grupo que consiste en:



y

10



15

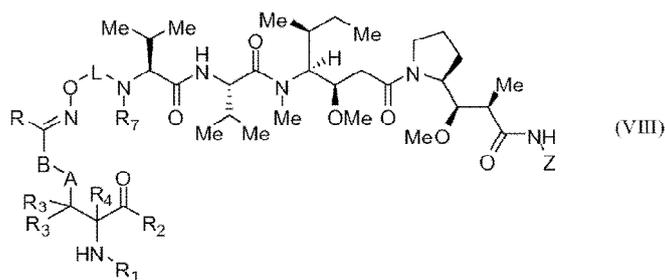
**A. Síntesis química de derivados de dolastatina enlazados a aminoácidos no naturales: derivados de dolastatina enlazados que contienen oxima**

20 [0264] Los derivados unidos a dolastatina de aminoácido 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 reactividad similar) para formar nuevos aminoácidos no naturales que comprenden un nuevo grupo oxima. Tal reacción de intercambio de oxima permite la funcionalización adicional de derivados unidos a dolastatina. Además, el derivado original unido a dolastatina que contiene un grupo oxima puede ser útil por derecho propio siempre que el enlace oxima sea estable en condiciones necesarias para incorporar el aminoácido en un polipéptido (por ejemplo, los métodos *in vivo*, *in vitro* y sintéticos químicos descritos aquí).

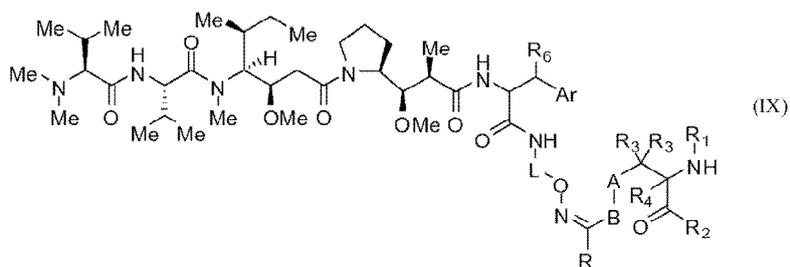
30 [0265] Por lo tanto, en ciertas descripciones descritas en este documento están derivados unidos a dolastatina de aminoácidos no naturales con cadenas laterales que comprenden un grupo oxima, un grupo oxima (que tiene reactividad similar a un grupo oxima y es estructuralmente similar a un grupo oxima), un grupo de oxima enmascarada (que puede convertirse fácilmente en un grupo oxima), o un grupo oxima protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo oxima tras la desprotección).

35 [0266] Dichos derivados unidos a dolastatina de aminoácido no naturales incluyen derivados unidos a dolastatina que tienen la estructura de Fórmula (VIII) o (IX):

40



50



60

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)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')<sub>2</sub>N=N- y -C(R')<sub>2</sub>N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

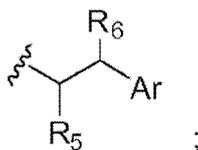
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

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

Z tiene la estructura de:



R<sub>5</sub> es H, COR<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o tiazol;

R<sub>8</sub> es OH

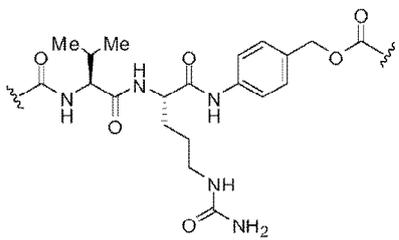
R<sub>6</sub> es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

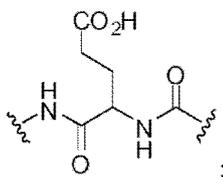
R<sub>7</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o hidrógeno;

L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en -alquileo-, -alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(Me)<sub>2</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-W-, -alquileo-C(O)-W-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-U-alquileo-C(O)-, y -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-U-alquileo-;

W tiene la estructura de:



U tiene la estructura de:



y  
cada n, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores que o iguales a uno;

o un metabolito activo, o un profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

**[0267]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R<sub>5</sub> es tiazol. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R<sub>6</sub> es H. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), Ar es fenilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R<sub>7</sub> es metilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), n es un número entero de 0 a 20. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), n es un número entero de 0 a 10. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), n es un número entero de 0 a 5.

**[0268]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R<sub>5</sub> es tiazol. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R<sub>5</sub> es hidrógeno. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R<sub>5</sub> es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas revelaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R<sub>5</sub> es -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, en el que alquileo es -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, o CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En ciertas descripciones de Fórmula (VIII) y (IX), el alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno.

**[0269]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R<sub>5</sub> es -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

**[0270]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R<sub>6</sub> es H.

**[0271]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), Ar es fenilo.

**[0272]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R<sub>7</sub> es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R<sub>7</sub> es hidrógeno.

**[0273]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), cada L es independientemente un enlazador escindible o un enlazador no escindible. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), cada L es independientemente un enlazador derivatizado de oligo (etilenglicol).

**[0274]** En ciertas descripciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), cada alquileo, alquileo', alquileo'' y alquileo''' es independientemente -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, o CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno.

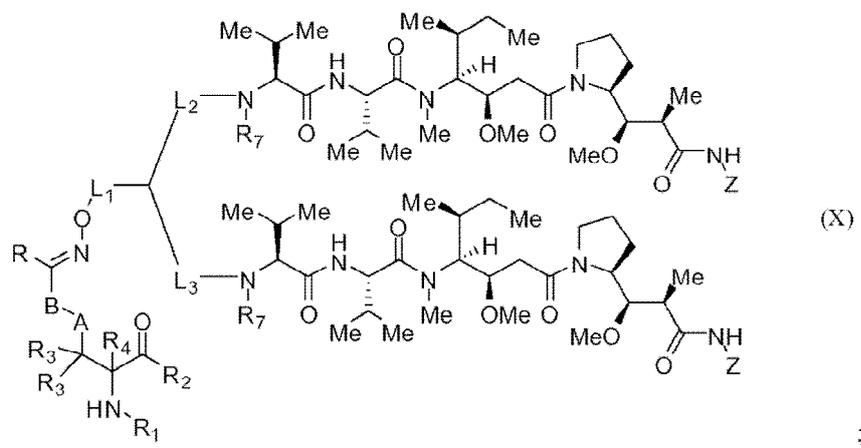
**[0275]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), cada n, n', n'', n''' y n'''' independientemente es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

**[0276]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) o (IX), R<sub>1</sub> es un polipéptido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) o (IX), R<sub>2</sub> es un polipéptido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) o (IX), el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (VIII) o (IX), el anticuerpo es herceptin. Dichos derivados unidos a dolastatina de aminoácido no naturales incluyen derivados unidos a dolastatina que tienen la estructura de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII):

5

10

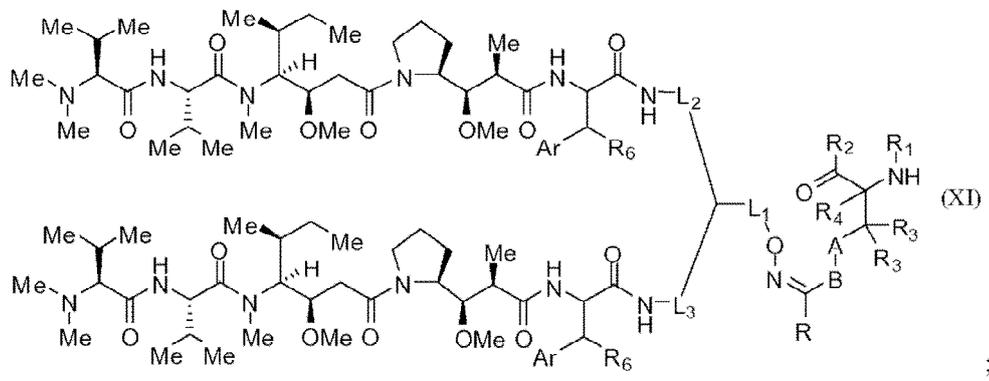
15



20

25

30

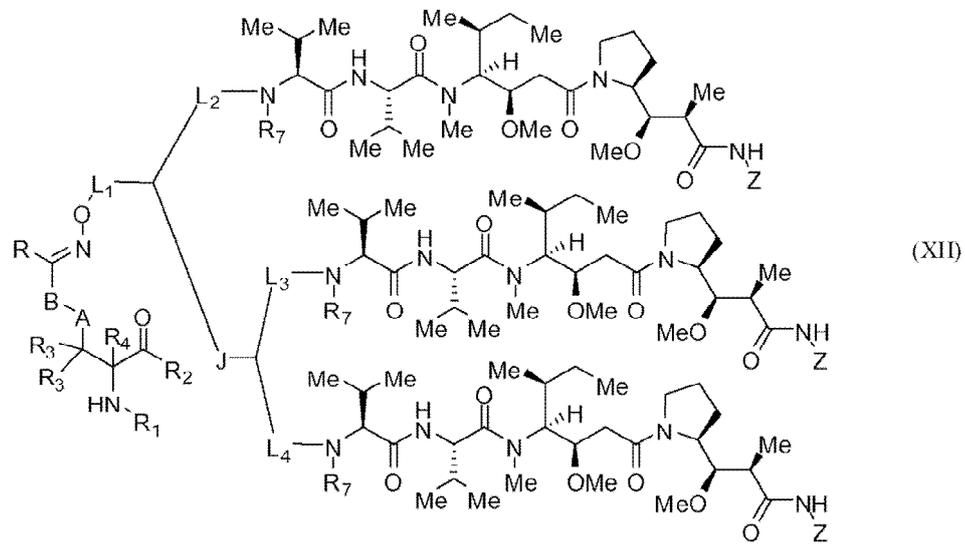


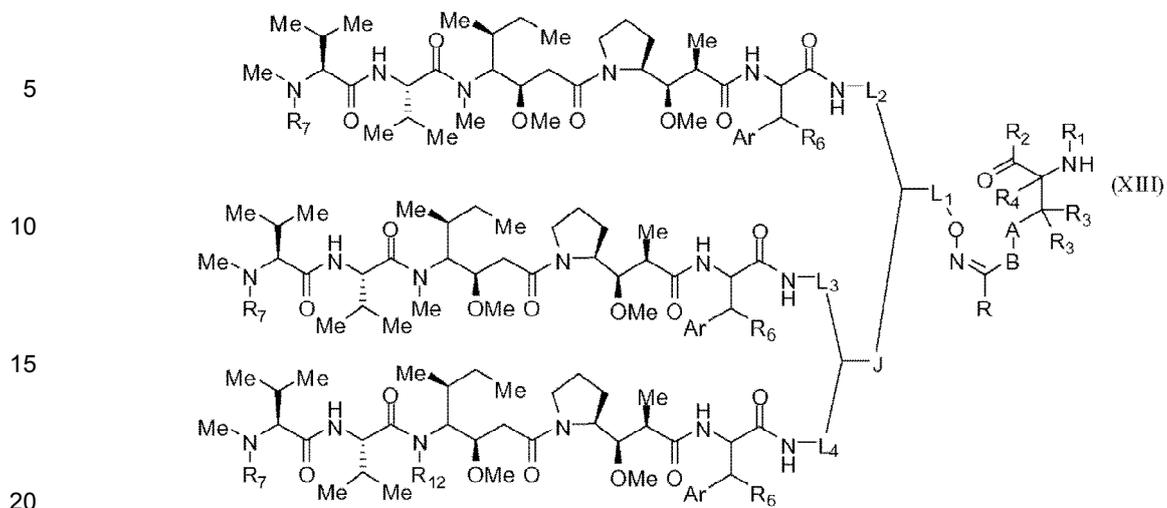
35

40

45

50





en donde:

25 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;

30 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)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

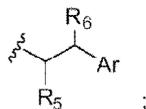
40 R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, al menos un aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

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

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

Z tiene la estructura de:

45



R<sub>5</sub> es H, CO<sub>2</sub>H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o tiazol;

R<sub>6</sub> es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

55

R<sub>7</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o hidrógeno;

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son cada uno de los enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en un enlace, -alquileno-, -(alquileno-O)<sub>n</sub>-alquileno-J-, -alquileno'-J-(alquileno-O)<sub>n</sub>-alquileno-, -J-(alquileno-O)<sub>n</sub>-alquileno-, -(alquileno-O)<sub>n</sub>-alquileno- J-(alquileno-O)<sub>n</sub>-alquileno-J'-, -(alquileno-O)<sub>n</sub>-alquileno-J-alquileno-', -W-, -alquileno-W-, alquileno'-J-(alquileno-NMe)<sub>n</sub>-alquileno-W-, -J-(alquileno-NMe)<sub>n</sub>-alquileno-W-, -J-alquileno-NMe-alquileno'-NMe-alquileno'-W- y -alquileno-J-alquileno'-NMe-alquileno'-NMe-alquileno'-W-;

60

W tiene la estructura de:

65



CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,  
 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En ciertas descripciones de los compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), el alquileo es metileno, etileno, propileno, butilenos, pentileno, hexileno o heptileno.

**[0286]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), cada n y n' es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100.

**[0287]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R<sub>1</sub> es un polipéptido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R<sub>2</sub> es un polipéptido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), el anticuerpo es herceptin.

**[0288]** En ciertas divulgaciones, los compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas divulgaciones, los compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII) son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas divulgaciones, los compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII) son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas divulgaciones, tales condiciones ácidas tienen un pH de 2 a 8. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y opcionalmente post traducción modificada.

**[0289]** Los aminoácidos no naturales a base de oximas se pueden sintetizar mediante métodos ya descritos en la técnica, o mediante métodos descritos en la presente memoria, que incluyen: (a) reacción de un aminoácido no natural que contiene hidroxilamina con un reactivo que contiene carbonilo o dicarbonilo; (b) reacción de un aminoácido no natural que contiene carbonilo o dicarbonilo con un reactivo que contiene hidroxilamina; o (c) reacción de un aminoácido no natural que contiene oxima con ciertos reactivos que contienen carbonilo o dicarbonilo.

***B. Estructura química y síntesis de derivados de dolastatina enlazados a aminoácidos no naturales: derivados de dolastatina unidos a aminas aromáticas alquiladas***

**[0290]** En un aspecto, los derivados del enlazador de dolastatina para la derivatización química de aminoácidos no naturales se basan en la reactividad de un grupo amino aromático. En divulgaciones adicionales o adicionales, al menos uno de los aminoácidos no naturales antes mencionados se incorpora en un derivado enlazador de dolastatina, es decir, tales realizaciones son derivados de dolastatina unidos a aminoácidos no naturales. En divulgaciones adicionales o adicionales, los derivados del enlazador de dolastatina se funcionalizan en sus cadenas laterales de modo que su reacción con un aminoácido derivado no natural genera un enlace amina. En divulgaciones adicionales o adicionales, los derivados de enlazador de dolastatina se seleccionan de derivados de enlazador de dolastatina que tienen cadenas laterales de aminas aromáticas. En divulgaciones adicionales o adicionales, los derivados del enlazador de dolastatina comprenden una cadena lateral enmascarada, que incluye un grupo amino aromático enmascarado. En divulgaciones adicionales o adicionales, los aminoácidos no naturales se seleccionan de aminoácidos que tienen cadenas laterales de aminas aromáticas. En divulgaciones adicionales o adicionales, los aminoácidos no naturales comprenden una cadena lateral enmascarada, que incluye un grupo amina aromático enmascarado.

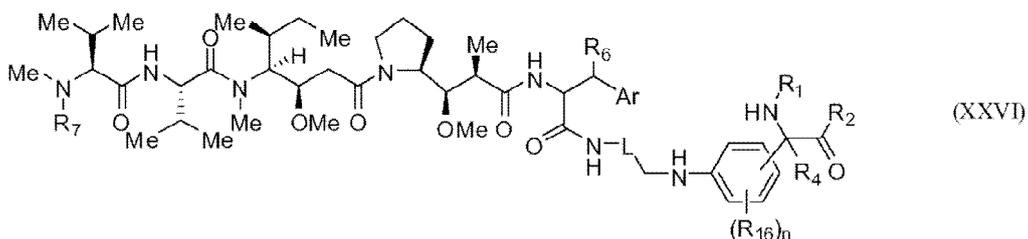
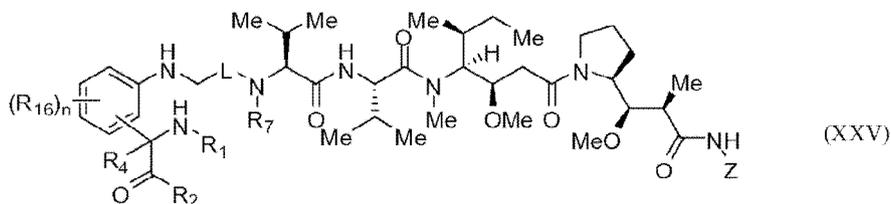
**[0291]** En otro aspecto, los derivados enlazadores de dolastatina sustituidos con carbonilo tales como, a modo de ejemplo, aldehídos y cetonas, para la producción de polipéptidos de aminoácidos no naturales derivatizados basados en un enlace amina. En una descripción adicional, los derivados enlazadores de dolastatina sustituidos con aldehído usados para derivatizar polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen aminas aromáticas mediante la formación de un enlace amina entre el enlazador de dolastatina derivatizante y el polipéptido de aminoácido no natural que contiene aminas aromáticas.

**[0292]** En divulgaciones adicionales o adicionales, los aminoácidos no naturales comprenden cadenas laterales de aminas aromáticas en las que la amina aromática se selecciona de una arilamina o una heteroarilamina. En una descripción adicional, los aminoácidos no naturales se parecen a un aminoácido natural en estructura pero contienen grupos amino aromáticos. En otra descripción, los aminoácidos no naturales se parecen a la fenilalanina o tirosina (aminoácidos aromáticos). En una descripción, los aminoácidos no naturales tienen propiedades que son distintas de las de los aminoácidos naturales. En una descripción, tales propiedades distintas son la reactividad química de la cadena lateral; en una divulgación adicional, esta distinta reactividad química permite que la cadena lateral del aminoácido no natural experimente una reacción mientras es una unidad de un polipéptido aunque las cadenas laterales de las unidades de aminoácidos que se producen de manera natural en el mismo polipéptido no se someten a la reacción mencionada anteriormente. En una realización adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural tiene una química ortogonal a las de los aminoácidos naturales. En una descripción adicional, la cadena

lateral del aminoácido no natural comprende un resto que contiene nucleófilo; en una descripción adicional, el resto que contiene nucleófilos en la cadena lateral del aminoácido no natural puede experimentar una reacción para generar una dolastatina derivatizada unida a aminas. En una descripción adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural comprende un resto que contiene electrófilo; en una descripción adicional, el resto que contiene electrófilo en la cadena lateral del aminoácido no natural puede sufrir un ataque nucleofílico para generar una dolastatina derivatizada unida a aminas. En cualquiera de las divulgaciones mencionadas anteriormente en este párrafo, el aminoácido no natural puede existir como una molécula separada o puede incorporarse en un polipéptido de cualquier longitud; si el último, entonces el polipéptido puede incorporar además aminoácidos naturales o no naturales.

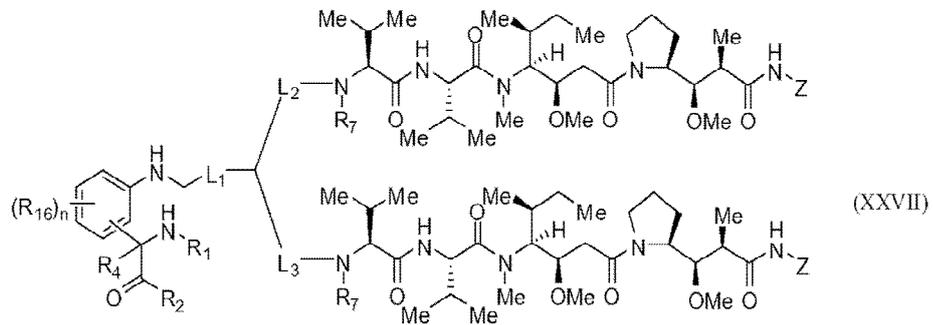
**[0293]** La modificación de aminoácidos no naturales descritos en la presente memoria usando reacciones de alquilación reductiva o de aminación reductiva tiene cualquiera o la totalidad de las siguientes ventajas. Primero, las aminas aromáticas pueden alquilarse reductivamente con compuestos que contienen carbonilo, que incluyen aldehídos y cetonas, en un intervalo de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 (y en ciertas realizaciones en un intervalo de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 7) para generar amina sustituida, que incluye enlaces de amina secundaria y terciaria. En segundo lugar, bajo estas condiciones de reacción, la química es selectiva para aminoácidos no naturales ya que las cadenas laterales de aminoácidos que se producen de forma natural no son reactivas. Esto permite la derivatización específica de sitio de polipéptidos que tienen aminoácidos incorporados no naturales que contienen restos de aminas aromáticas o restos de aldehídos protegidos, que incluyen, a modo de ejemplo, proteínas recombinantes. Dichos polipéptidos y proteínas derivatizadas se pueden preparar de ese modo como productos homogéneos definidos. Tercero, las condiciones suaves necesarias para efectuar la reacción de un resto de amina aromática en un aminoácido, que se ha incorporado a un polipéptido, con un reactivo que contiene aldehído generalmente no destruyen irreversiblemente la estructura terciaria del polipéptido (exceptuando, por supuesto, donde el propósito de la reacción consiste en destruir dicha estructura terciaria). De manera similar, las condiciones suaves necesarias para efectuar la reacción de un resto aldehído en un aminoácido, que se ha incorporado en un polipéptido y desprotegido, con un reactivo que contiene amina aromática generalmente no destruyen irreversiblemente la estructura terciaria del polipéptido (excepto, por supuesto, donde el propósito de la reacción consiste en destruir tal estructura terciaria). En cuarto lugar, la reacción ocurre rápidamente a temperatura ambiente, lo que permite el uso de muchos tipos de polipéptidos o reactivos que de otro modo serían inestables a temperaturas más altas. En quinto lugar, la reacción se produce fácilmente en condiciones acuosas, permitiendo de nuevo el uso de polipéptidos y reactivos incompatibles (en cualquier medida) con soluciones no acuosas. Seis, la reacción se produce fácilmente incluso cuando la relación de polipéptido o aminoácido a reactivo es estequiométrica, de tipo estequiométrico o casi estequiométrico, de modo que es innecesario añadir un exceso de reactivo o polipéptido para obtener una cantidad útil de producto de reacción. Séptimo, la amina resultante se puede producir regioselectivamente y/o regioespecíficamente, dependiendo del diseño de las porciones de amina y carbonilo de los reactivos. Finalmente, la alquilación reductiva de aminas aromáticas con reactivos que contienen aldehído, y la aminación reductiva de aldehídos con reactivos que contienen aminas aromáticas, genera amina, que incluye enlaces de amina secundaria y terciaria, que son estables en condiciones biológicas.

**[0294]** Aminoácidos no naturales con grupos reactivos nucleofílicos, tales como, solo a modo de ejemplo, un grupo amino aromático (que incluye grupos amina secundarios y terciarios), un grupo amina aromático enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo amina aromático), o un grupo amina aromático protegido (que tiene reactividad similar a un grupo amino aromático después de la desprotección) permite una variedad de reacciones para unir moléculas mediante diversas reacciones, que incluyen, pero no se limitan a, reacciones de alquilación reductiva con aldehído que contiene derivados unidos a dolastatina. Dichos derivados de dolastatina unidos a aminoácidos no naturales alquilados incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX):



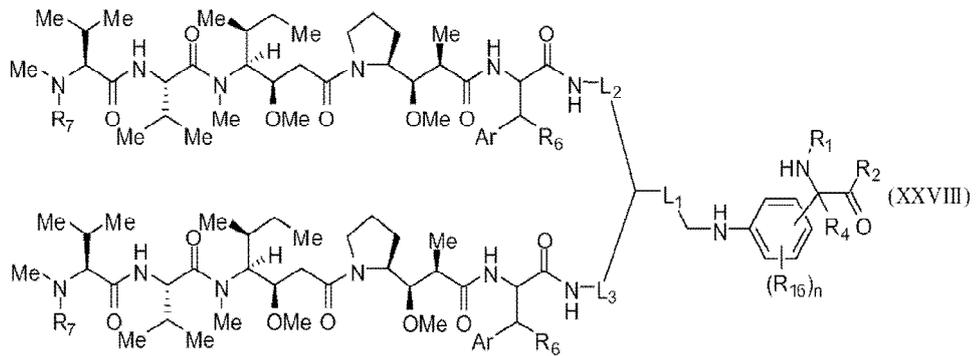
5

10



15

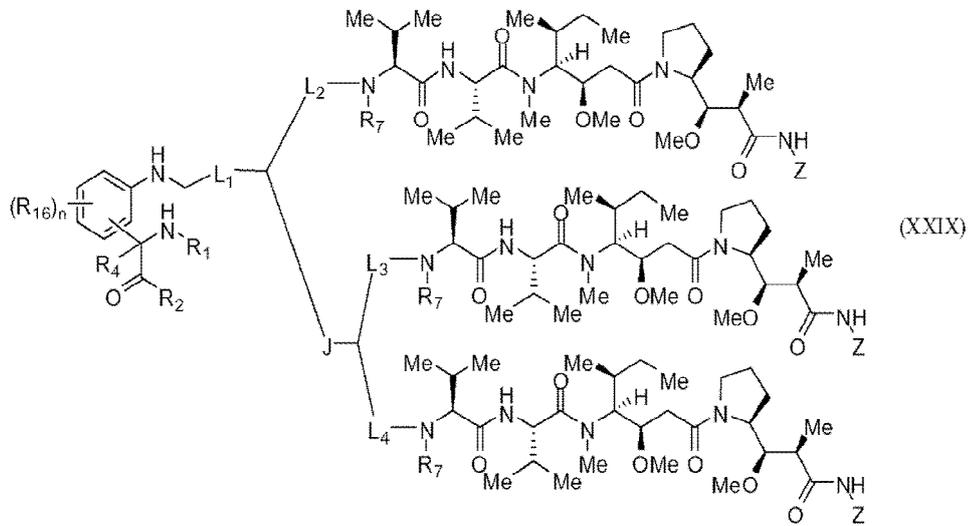
20



25

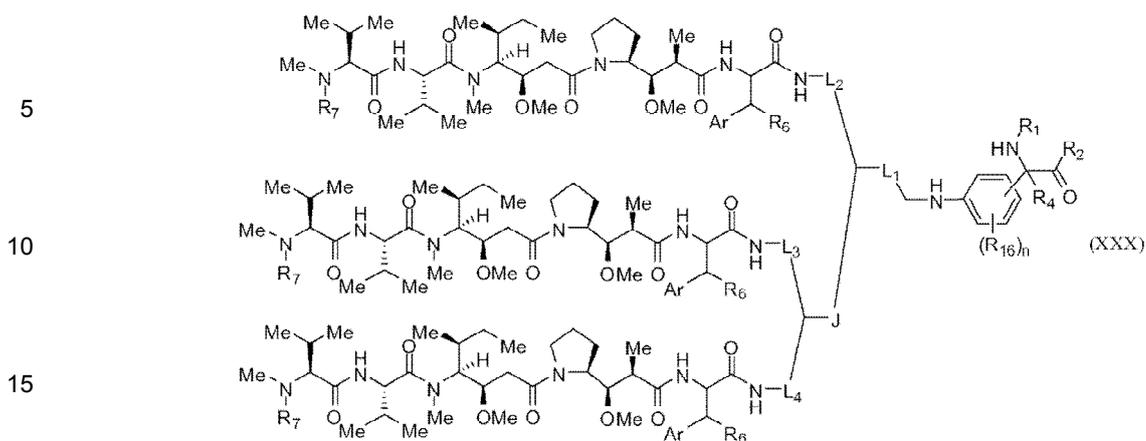
30

35



40

45



donde:

25 Z tiene la estructura de:



35 R<sub>5</sub> es H, CO<sub>2</sub>H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o tiazol;

R<sub>6</sub> es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

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

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

45 R<sub>4</sub> es H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido;

R<sub>7</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o hidrógeno;

L, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son cada uno de los enlazadores seleccionados del grupo que consiste en un enlace, -alquileo-

50 -, -alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-

55 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(Me)<sub>2</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- NHC(O)-(alquileo-O)<sub>n</sub>- alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-W-, -alquileo-C(O)-W-

60 -, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-, -alquileo'-J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-alquileo', -J-

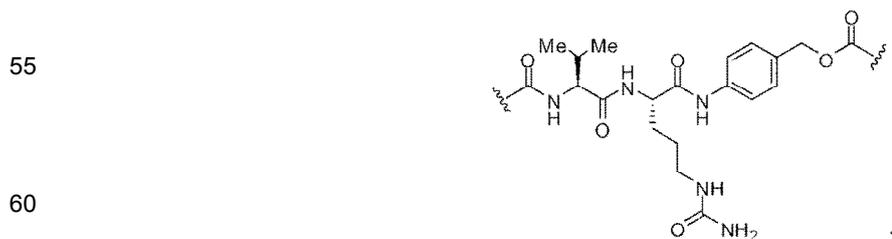
65 -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J'-, -W-, -alquileo-W-, alquileo'-J-

70 -(alquileo-NMe)<sub>n</sub>- alquileo-W- y J-(alquileo-NMe)<sub>n</sub>-alquileo-W-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-U-alquileo-C(O)-, -

75 -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo- U-alquileo-; -J-alquileo-NMe-alquileo-NMe-alquileo"-W- y -alquileo-J-alquileo-

80 NMe-alquileo" - NMe-alquileo"' - W-;

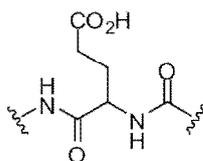
W tiene la estructura de:



U tiene la estructura de:

65

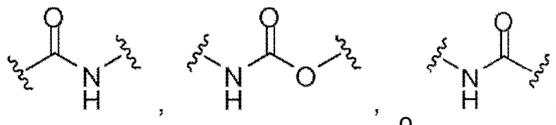
5



10

cada J y J' tienen independientemente la estructura de:

15



20

cada n y n' son independientemente enteros mayores que o iguales a uno; y

cada R<sub>16</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, NO<sub>2</sub>, CN y alquilo sustituido.

25

Dichos derivados de dolastatina enlazados a aminoácidos no naturales alquilados también pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido, polímero, polisacárido o polinucleótido de aminoácido no natural y opcionalmente reductivamente alquilados.

30

**[0295]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>5</sub> es tiazol o ácido carboxílico. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>6</sub> es H. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), Ar es fenilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>7</sub> es metilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), n es un número entero de 0 a 20. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), n es un número entero de 0 a 10. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX) o (XXIV), n es un número entero de 0 a 5.

40

**[0296]** En ciertas descripciones de los compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>5</sub> es tiazol o ácido carboxílico. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>5</sub> es hidrógeno. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>5</sub> es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>5</sub> es -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, en donde alquileo es -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En ciertas divulgaciones de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), el alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno.

50

**[0297]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>5</sub> es -NH-(alquileo-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, en donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

55

**[0298]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>6</sub> es H. En algunas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>6</sub> es hidroxilo.

60

**[0299]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), Ar es fenilo.

65

**[0300]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>7</sub> es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>7</sub> es hidrógeno.

**[0301]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), cada L,

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> es independientemente escindible enlazador o enlazador no escindible. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), cada L, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> es independientemente un enlazador derivatizado de oligo (etilenglicol).

5 **[0302]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), cada alquileo, alquileo', alquileo" y alquileo" es independientemente -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XIX), (XX), (XXI), (XXII), (XXIII) o (XXIV), alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno.

15 **[0303]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), cada n, n', n", n"', y n'''' de forma independiente es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

20 **[0304]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX), o (XXX), R<sub>1</sub> es un polipéptido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), R<sub>2</sub> es un polipéptido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX), el anticuerpo es herceptin.

25 **[0305]** Los compuestos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX), o (XXX) se pueden formar mediante la alquilación reductiva de compuestos de amina aromática con reactivos que contienen carbonilo tales como, a título de ejemplo, cetonas, ésteres, tioésteres y aldehídos.

30 **[0306]** En algunas divulgaciones, los restos de amina enmascarados de aminoácidos no naturales contenidos en polipéptidos se reducen inicialmente para dar aminoácidos no naturales que contienen restos de aminas aromáticas incorporados en polipéptidos de aminoácidos no naturales. Dichos restos de aminas aromáticas se alquilan luego reductivamente con reactivos que contienen carbonilo descritos anteriormente para dar polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX). Dichas reacciones también se pueden aplicar a aminoácidos no naturales incorporados en polímeros sintéticos, polisacáridos o polinucleótidos. Adicionalmente, tales reacciones se pueden aplicar a aminoácidos no naturales no incorporados. A modo de ejemplo, el agente reductor usado para reducir restos de amina enmascarados incluye, pero no se limita a, TCEP, Na<sub>2</sub>S, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, LiAlH<sub>4</sub>, B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> y NaBH<sub>4</sub>. A modo de ejemplo solamente, puede producirse una alquilación reductiva en tampones acuosos con un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 y usando un agente reductor suave, tal como, a modo de ejemplo solamente, cianoborohidruro sódico (NaBCNH<sub>3</sub>). Además, se pueden usar otros agentes reductores para la alquilación reductiva que incluyen, pero no se limitan a, TCEP, Na<sub>2</sub>S, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, LiAlH<sub>4</sub>, B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> y NaBH<sub>4</sub>.

45 **[0307]** Una síntesis ejemplar no limitante de polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen aminoácidos de Fórmula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX) o (XXX) mediante alquilación reductiva de restos de amina aromáticos secundarios, contenidos en aminoácidos no naturales, con reactivos que contienen carbonilo descritos anteriormente. Tales alquilaciones reductivas dan polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales con restos de aminas aromáticos terciarios. Dichas reacciones también se pueden aplicar a aminoácidos no naturales incorporados en polímeros sintéticos, polisacáridos o polinucleótidos. Adicionalmente, tales reacciones se pueden aplicar a aminoácidos no naturales no incorporados. A modo de ejemplo solamente, puede producirse una alquilación reductiva en tampones acuosos con un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 y usando un agente reductor suave, tal como, a modo de ejemplo solamente, cianoborohidruro sódico (NaBCNH<sub>3</sub>). Además, se pueden usar otros agentes reductores para la alquilación reductiva que incluyen, pero no se limitan a, TCEP, Na<sub>2</sub>S, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, LiAlH<sub>4</sub>, B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> y NaBH<sub>4</sub>.

55 **C. Síntesis química de derivados de dolastatina enlazados a aminoácidos no naturales: derivados de dolastatina enlazados que contienen heteroarilo**

60 **[0308]** En un aspecto se encuentran aminoácidos no naturales para la derivatización química de derivados unidos a dolastatina basados en la reactividad de un grupo dicarbonilo, que incluye un grupo que contiene al menos un grupo cetona, y/o al menos un grupo aldehído, y/o al menos un grupo éster, y/o al menos un ácido carboxílico, y/o al menos un grupo tioéster, y en donde el grupo dicarbonilo puede ser un grupo 1,2-dicarbonilo, un grupo 1,3-dicarbonilo o un grupo 1,4-dicarbonilo. En aspectos adicionales se encuentran los aminoácidos no naturales para la derivatización química de derivados unidos a dolastatina basados en la reactividad de un grupo diamina, que incluye un grupo hidrazina, un grupo amidina, un grupo imina, un grupo 1,1-diamina, un grupo 1,2-diamina, un grupo 1,3-diamina y un grupo 1,4-diamina. En divulgaciones adicionales, al menos uno de los aminoácidos no naturales antes mencionados se incorpora en un derivado unido a dolastatina, es decir, tales descripciones son derivados de

dolastatina unidos a aminoácidos no naturales. En divulgaciones adicionales, los aminoácidos no naturales se funcionalizan en sus cadenas laterales de modo que su reacción con una molécula de derivatización genera un enlace, que incluye un enlace heterocíclico, que incluye un heterociclo que contiene nitrógeno, y/o un enlace a base aldólica. En divulgaciones adicionales son polipéptidos de aminoácidos no naturales que pueden reaccionar con un enlazador de dolastatina derivatizante para generar derivados de dolastatina enlazados a aminoácidos no naturales que contienen un enlace, que incluye un enlace heterocíclico, que incluye un heterociclo que contiene nitrógeno, y/o un enlace basado en aldol. En divulgaciones adicionales, los aminoácidos no naturales se seleccionan de aminoácidos que tienen cadenas laterales de dicarbonilo y/o diamina. En realizaciones adicionales, los aminoácidos no naturales comprenden una cadena lateral enmascarada, que incluye un grupo diamina enmascarado y/o un grupo dicarbonilo enmascarado. En divulgaciones adicionales, los aminoácidos no naturales comprenden un grupo seleccionado de: ceto-amina (es decir, un grupo que contiene tanto una cetona como una amina); cetoalquino (es decir, un grupo que contiene tanto una cetona como un alquino); y una eno-diona (es decir, un grupo que contiene un grupo dicarbonilo y un alqueno).

**[0309]** En divulgaciones adicionales, los aminoácidos no naturales comprenden cadenas laterales de dicarbonilo en donde el carbonilo se selecciona de una cetona, un aldehído, un ácido carboxílico o un éster, que incluye un tioéster. En otra descripción se encuentran aminoácidos no naturales que contienen un grupo funcional que es capaz de formar un heterociclo, que incluye un heterociclo que contiene nitrógeno, tras el tratamiento con un reactivo funcionalizado apropiadamente. En una descripción adicional, los aminoácidos no naturales se parecen a un aminoácido natural en estructura pero contienen uno de los grupos funcionales mencionados anteriormente. En otra descripción, los aminoácidos no naturales se parecen a fenilalanina o tirosina (aminoácidos aromáticos); mientras que en una descripción separada, los aminoácidos no naturales se parecen a alanina y leucina (aminoácidos hidrófobos). En una descripción, los aminoácidos no naturales tienen propiedades que son distintas de las de los aminoácidos naturales. En una descripción, tales propiedades distintas son la reactividad química de la cadena lateral, en una divulgación adicional esta distinta reactividad química permite que la cadena lateral del aminoácido no natural experimente una reacción mientras que sea una unidad de un polipéptido aunque las cadenas laterales de las unidades de aminoácidos de origen natural en el mismo polipéptido no experimentan la reacción mencionada anteriormente. En una descripción adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural tiene una química ortogonal a las de los aminoácidos naturales. En una descripción adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural comprende un resto que contiene electrófilo; en una divulgación adicional, el resto que contiene electrófilos en la cadena lateral del aminoácido no natural puede experimentar un ataque nucleofílico para generar una proteína derivada de heterociclo, que incluye una proteína derivada de heterociclo que contiene nitrógeno. En cualquiera de las divulgaciones mencionadas anteriormente en este párrafo, el aminoácido no natural puede existir como una molécula separada o puede incorporarse en un polipéptido de cualquier longitud; si el último, entonces el polipéptido puede incorporar además aminoácidos naturales o no naturales.

**[0310]** En otro aspecto, las moléculas sustituidas con diamina, en las que el grupo diamina se selecciona de una hidrazina, una amidina, una imina, una 1,1-diamina, una 1,2-diamina, una 1,3-diamina y un grupo 1,4-diamina, para la producción de derivados de dolastatina enlazados a aminoácidos no naturalizados derivatizados basados en un heterociclo, que incluye un enlace de heterociclo que contiene nitrógeno. En una descripción adicional, los derivados de dolastatina sustituidos con diamina se usan para derivatizar polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen dicarbonilo a través de la formación de un heterociclo, que incluye un hemociclo que contiene nitrógeno, un enlace entre la molécula derivatizante y el no dicarbonilo que contiene polipéptido de aminoácido natural. En divulgaciones adicionales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen dicarbonilo antes mencionados son polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen dicetona. En divulgaciones adicionales, los aminoácidos no naturales que contienen dicarbonilo comprenden cadenas laterales en las que el carbonilo se selecciona de una cetona, un aldehído, un ácido carboxílico o un éster, que incluye un tioéster. En realizaciones adicionales, las moléculas sustituidas con diamina comprenden un grupo seleccionado de una funcionalidad deseada. En una descripción adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural tiene una química ortogonal a las de los aminoácidos naturales que permite que el aminoácido no natural reaccione selectivamente con las moléculas sustituidas con diamina. En una descripción adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural comprende un resto que contiene electrófilos que reacciona selectivamente con la molécula que contiene diamina; en una realización adicional, el resto que contiene electrófilos en la cadena lateral del aminoácido no natural puede experimentar un ataque nucleofílico para generar una proteína derivada de heterociclo, que incluye una proteína derivada de heterociclo que contiene nitrógeno. En un aspecto adicional relacionado con las descripciones descritas en este párrafo, están los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados que resultan de la reacción de la molécula de derivatización con los polipéptidos de aminoácidos no naturales. Otras divulgaciones incluyen cualquier modificación adicional de los polipéptidos de aminoácidos no naturales ya modificados.

**[0311]** En otro aspecto, las moléculas sustituidas con dicarbonilo para la producción de polipéptidos de aminoácidos no naturales derivatizados se basan en un heterociclo, que incluye un enlace de heterociclo que contiene nitrógeno. En una descripción adicional, las moléculas sustituidas con dicarbonilo se usan para derivatizar polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen diamina mediante la formación de un heterociclo, que incluye un grupo heterociclo que contiene nitrógeno. En una descripción adicional se encuentran moléculas sustituidas con dicarbonilo que pueden formar dicho heterociclo, que incluyen grupos heterociclos que contienen nitrógeno con un polipéptido de aminoácido no natural que contiene diamina en un intervalo de pH entre aproximadamente 4 y

aproximadamente 8. En una divulgación adicional, se usan moléculas sustituidas con dicarbonilo para derivatizar diamina que contienen polipéptidos de aminoácidos no naturales mediante la formación de un heterociclo, que incluye un heterociclo que contiene nitrógeno, un enlace entre la molécula de derivatización y los polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen diamina. En una descripción adicional, las moléculas sustituidas con dicarbonilo son moléculas sustituidas con dicetona, en otros aspectos moléculas sustituidas con cetoaldehído, en otros aspectos moléculas sustituidas con cetoácido, en otros aspectos moléculas sustituidas con cetoéster, que incluyen moléculas sustituidas con ketotioéster. En otras divulgaciones, las moléculas sustituidas con dicarbonilo comprenden un grupo seleccionado de una funcionalidad deseada. En divulgaciones adicionales, las moléculas sustituidas con aldehído son moléculas de polietilenglicol (PEG) sustituidas con aldehído. En una descripción adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural tiene una química ortogonal a las de los aminoácidos naturales que permite que el aminoácido no natural reaccione selectivamente con las moléculas sustituidas con carbonilo. En una descripción adicional, la cadena lateral del aminoácido no natural comprende un resto (por ejemplo, un grupo diamina) que reacciona selectivamente con la molécula que contiene dicarbonilo; en una realización adicional, el resto nucleofílico en la cadena lateral del aminoácido no natural puede experimentar un ataque electrofílico para generar una proteína derivada heterocíclica, que incluye una proteína derivada de heterociclo que contiene nitrógeno. En un aspecto adicional relacionado con las descripciones descritas en este párrafo, se encuentran los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados que resultan de la reacción de la molécula de derivación con los polipéptidos de aminoácidos no naturales. Otras divulgaciones incluyen cualquier modificación adicional de los polipéptidos de aminoácidos no naturales ya modificados.

**[0312]** En un aspecto, se describen métodos para derivatizar proteínas mediante la reacción de reactivos de carbonilo e hidracina para generar una proteína derivada de heterociclo, que incluye una dolastatina derivada de heterociclo que contiene nitrógeno. Se incluyen dentro de este aspecto los métodos para la derivatización de derivados de enlazador de dolastatina basados en la condensación de reactivos que contienen carbonilo e hidracina para generar una dolastatina derivatizada con heterociclo, que incluye dolastatina derivada de heterociclo que contiene nitrógeno. En divulgaciones adicionales se encuentran métodos para derivatizar derivados de dolastatina que contienen cetona o derivados de dolastatina que contienen aldehído con aminoácidos no naturales funcionalizados con hidrazina. En aspectos adicionales, la molécula sustituida con hidrazina puede incluir proteínas, otros polímeros y moléculas pequeñas.

**[0313]** En otro aspecto, son métodos para la síntesis química de moléculas sustituidas con hidrazina para la derivatización de derivados de dolastatina sustituidos con carbonilo. En una descripción, la molécula sustituida con hidrazina es un derivado unido a dolastatina adecuado para la derivatización de polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen carbonilo, incluyendo, a modo de ejemplo solamente, polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen cetona o aldehído.

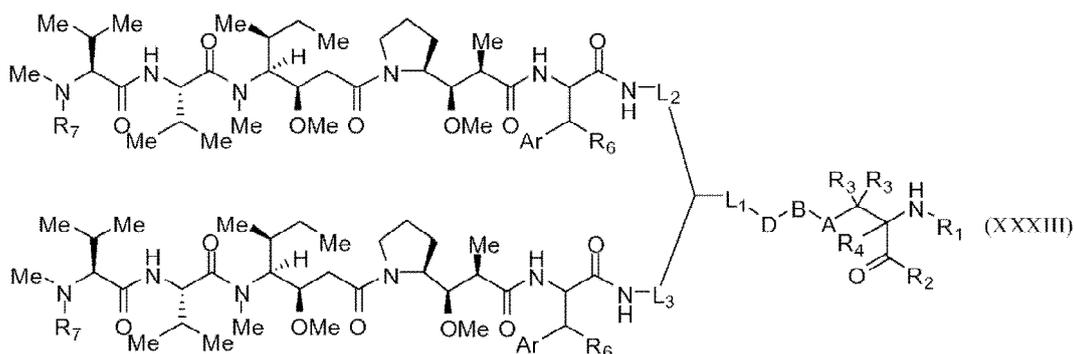
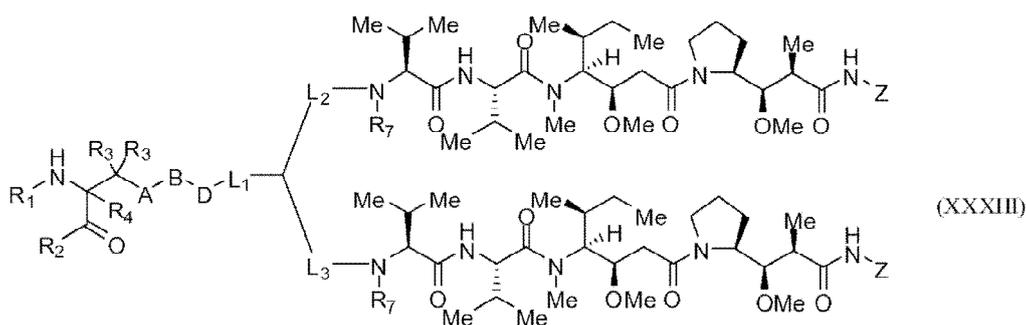
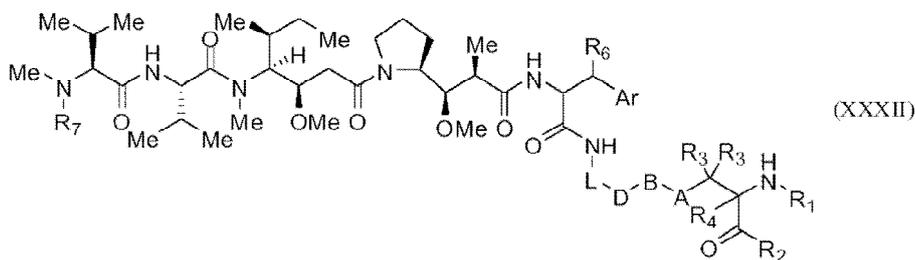
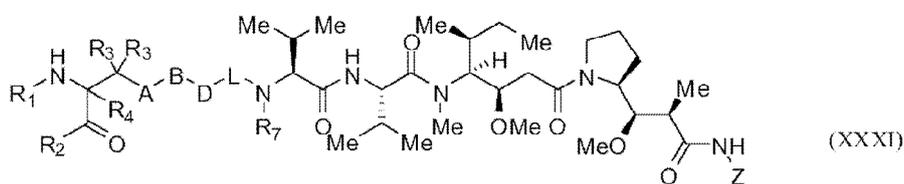
**[0314]** En un aspecto, son aminoácidos no naturales para la derivatización química de análogos de dolastatina basados en un enlace quinoxalina o fenazina. En divulgaciones adicionales, los aminoácidos no naturales se funcionalizan en sus cadenas laterales de modo que su reacción con un enlazador de dolastatina derivante genera un enlace quinoxalina o fenazina. En divulgaciones adicionales, los aminoácidos no naturales se seleccionan de aminoácidos que tienen cadenas laterales de 1,2-dicarbonilo o 1,2-arildiamina. En divulgaciones adicionales, los aminoácidos no naturales se seleccionan de aminoácidos que tienen cadenas laterales de 1,2-dicarbonilo o 1,2-arildiamina protegidas o enmascaradas. También se incluyen equivalentes de cadenas laterales de 1,2-dicarbonilo, o equivalentes protegidos o enmascarados a cadenas laterales de 1,2-dicarbonilo.

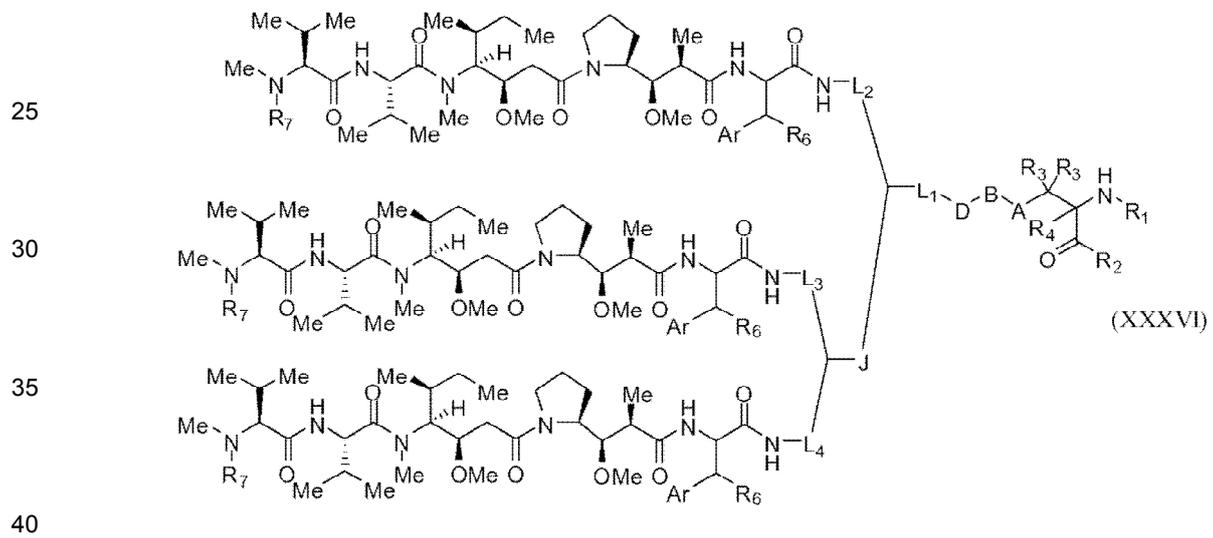
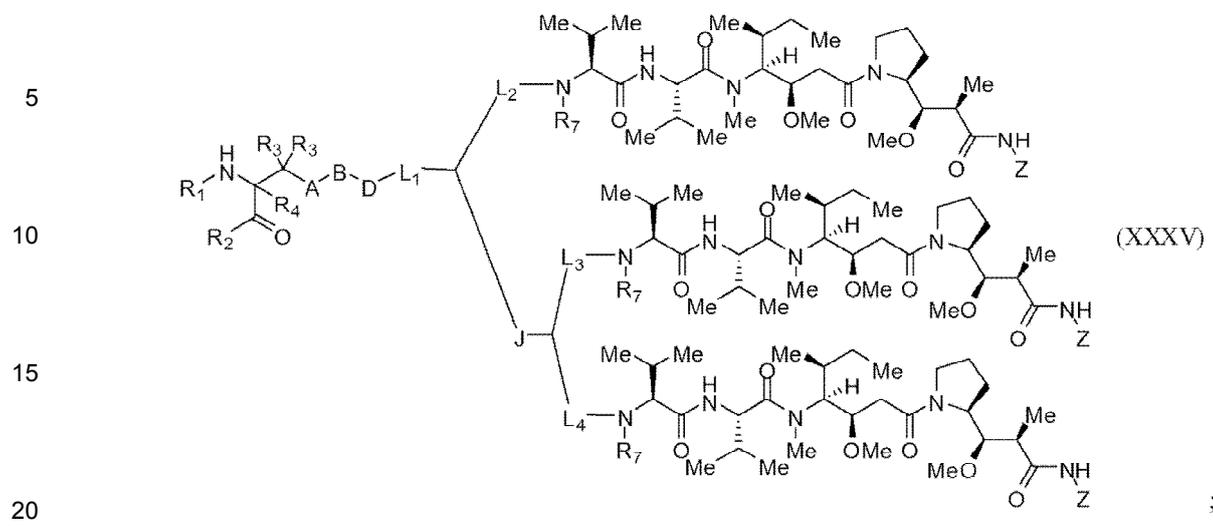
**[0315]** En otro aspecto, se derivan moléculas para la producción de polipéptidos de aminoácidos no naturales derivatizados basados en enlaces quinoxalina o fenazina. En una descripción, los derivados de enlazador de dolastatina sustituidos con 1,2-dicarbonilo se usan para derivatizar polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen 1,2-arildiamina para formar enlaces de quinoxalina o fenazina. En otra descripción, los derivados de enlazador de dolastatina sustituidos con 1,2-arildiamina usados para derivatizar polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen 1,2-dicarbonilo forman enlaces de quinoxalina o fenazina. En un aspecto adicional relacionado con las divulgaciones anteriores están los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados que resultan de la reacción del enlazador de dolastatina derivatizante con los polipéptidos de aminoácidos no naturales. En una descripción, los polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen 1,2-arildiamina se derivatizan con derivados de enlazador de dolastatina sustituidos con 1,2-dicarbonilo para formar enlaces de quinoxalina o fenazina. En otra descripción, los polipéptidos de aminoácidos no naturales que contienen 1,2-dicarbonilo se derivatizan con derivados de enlazador de dolastatina sustituidos con 1,2-arildiamina para formar enlaces de quinoxalina o fenazina.

**[0316]** Se proporcionan aquí en ciertas divulgaciones moléculas de derivación para la producción de compuestos tóxicos que comprenden polipéptidos de aminoácidos no naturales basados en enlaces de triazol. En algunas divulgaciones, la reacción entre el primer y segundo grupos reactivos puede proceder a través de una reacción dipolarófila. En ciertas divulgaciones, el primer grupo reactivo puede ser una azida y el segundo grupo reactivo puede ser un alquino. En descripciones adicionales o alternativas, el primer grupo reactivo puede ser un alquino y el segundo grupo reactivo puede ser una azida. En algunas divulgaciones, la reacción de cicloaddición de Huisgen (véase, por ejemplo, Huisgen, en 1,3-DIPOLAR CICLOADDITION CHEMISTRY, (editor Padwa, A., 1984), páginas 1-176) prevé la incorporación de codificaciones no naturales los aminoácidos que llevan cadenas laterales que

contienen azida y alquino permiten que los polipéptidos resultantes se modifiquen con una selectividad extremadamente alta. En ciertas divulgaciones, tanto la azida como los grupos funcionales alquino son inertes hacia los veinte aminoácidos comunes que se encuentran en polipéptidos de origen natural. Sin embargo, al acercarse, la naturaleza de "carga de resorte" de los grupos azida y alquino se revela y reaccionan de forma selectiva y eficiente a través de la reacción de cicloadición de Huisgen [3 2] para generar el triazol correspondiente. Véase, por ejemplo, Chin et al., Science 301: 964-7 (2003); Wang y otros, J. Am. Chem. Soc., 125, 3192 - 3193 (2003); Chin y col., J. Am. Chem. Soc., 124: 9026 - 9027 (2002). La reacción de cicloadición que implica polipéptidos que contienen azida o alquino puede llevarse a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas mediante la adición de Cu(II) (por ejemplo, en forma de una cantidad catalítica de CuSO<sub>4</sub>) en presencia de un agente reductor para reducir Cu(II) a Cu(I), in situ, en cantidad catalítica. Véase, por ejemplo, Wang y col., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192 - 3193 (2003); Tornøe y otros, J. Org. Chem. 67: 3057 - 3064 (2002); Rostovtsev, Angew. Chem. Int. Ed. 41: 2596 - 2599 (2002). Los agentes reductores preferidos incluyen ascorbato, cobre metálico, quinina, hidroquinona, vitamina K, glutatión, cisteína, Fe<sup>2</sup>, CO<sup>2</sup> y un potencial eléctrico aplicado.

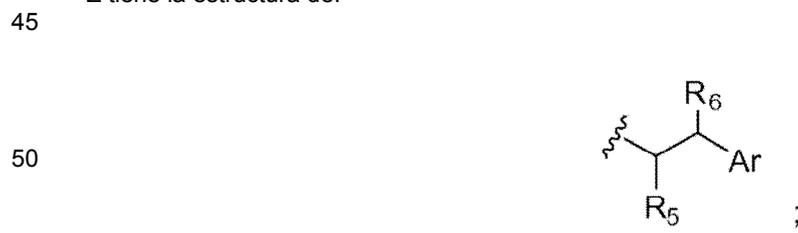
**[0317]** Dichos derivados de dolastatina unidos a heteroarilo de aminoácido no naturales incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI):





en donde:

Z tiene la estructura de:



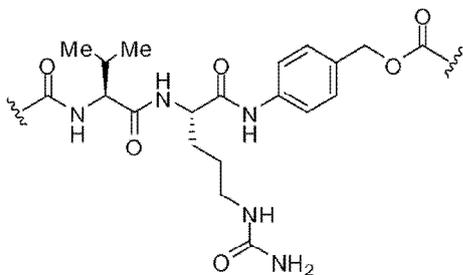
55 R<sub>5</sub> es H, CO<sub>2</sub>H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o tiazol;  
R<sub>6</sub> es OH o H;  
Ar es fenilo o piridina;

60 R<sub>1</sub> es H, un grupo protector de amino, resina, al menos un aminoácido, polipéptido o polinucleótido;  
R<sub>2</sub> es OH, un grupo protector de éster, resina, al menos un aminoácido, polipéptido o polinucleótido;  
R<sub>4</sub> es H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido;  
R<sub>7</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o hidrógeno;  
L, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son cada uno de los enlazadores seleccionados del grupo que consiste en un enlace, -alquileno-, -  
65 (alquileno-C(O)-), -alquileno-J-, -(alquileno-O)<sub>n</sub>-alquileno-, -(alquileno-O)<sub>n</sub>-alquileno-C(O)-, -(alquileno-O)<sub>n</sub>-J-, -  
(alquileno-O)<sub>n</sub>-J-alquileno-, -(alquileno-O)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(Me)<sub>2</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHC(O)-(alquileno-O)<sub>n</sub>-  
alquileno-, -(alquileno-O)<sub>n</sub>-alquileno-W-, -alquileno-C(O)-W-, -(alquileno-O)<sub>n</sub>-alquileno-J-, -alquileno'-J-(alquileno-O)<sub>n</sub>-

alquileno-,  $-(\text{alquileno-O})_n\text{-alquileno-J-alquileno}'$ ,  $-\text{J}(\text{alquileno-O})_n\text{-alquileno-}$ ,  $-(\text{alquileno-O})_n\text{-alquileno-J}(\text{alquileno-O})_n\text{-alquileno-J}'$ ,  $-\text{W-}$ ,  $-\text{alquileno-W-}$ ,  $\text{alquileno}'\text{-J}(\text{alquileno-NMe})_n\text{-alquileno-W-}$ ,  $-\text{J}(\text{alquileno-NMe})_n\text{-alquileno-W-}$ ,  $-(\text{alquileno-O})_n\text{-alquileno-U-alquileno-C(O)-}$ ,  $-(\text{alquileno-O})_n\text{-alquileno-U-alquileno-}$ ;  $-\text{J-alquileno-NMe-alquileno-NMe-alquileno}'\text{-W-}$ , y  $-\text{alquileno-J-alquileno}'\text{-N-metilo}'\text{-NMe-alquileno}'\text{-W-}$ ;

5 W tiene la estructura de:

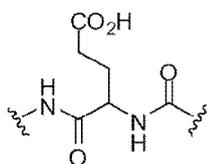
10



15

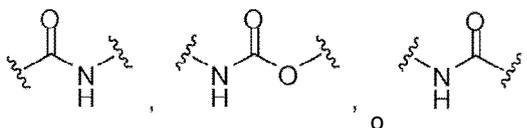
20 U tiene la estructura de:

25



30 cada J y J' tienen independientemente la estructura de:

35

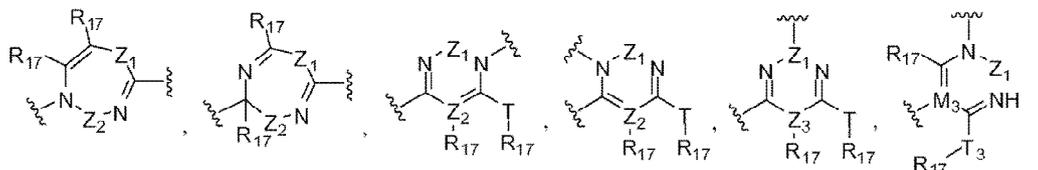


40 cada n y n' son independientemente enteros mayores que o iguales a uno;

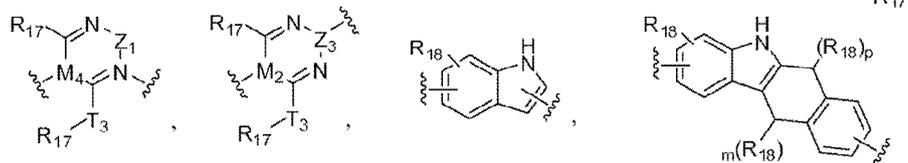
40

D tiene la estructura de:

45

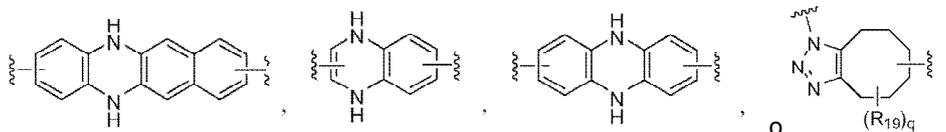


50



55

60



65 cada R<sub>17</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialquenoilo, óxido de polialquenoilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido,  $-(\text{alquileno o alquileno sustituido})\text{-ON}(\text{R}^{\prime})_2$ ,  $-(\text{alquileno o$

alquileo sustituido)-C(O)SR", -(alquileo o alquileo sustituido))-S-S-(arilo o arilo sustituido), -C(O)R", -C(O)<sub>2</sub>R", o -C(O)N(R")<sub>2</sub>, donde cada R" es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido;

5 cada Z<sub>1</sub> es un enlace, CR<sub>17</sub>R<sub>17</sub>, O, S, NR', CR<sub>17</sub>R<sub>17</sub>-CR<sub>17</sub>R<sub>17</sub>, CR<sub>17</sub>R<sub>17</sub>-O, O-CR<sub>17</sub>R<sub>17</sub>, CR<sub>17</sub>R<sub>17</sub>-S, S-CR<sub>17</sub>R<sub>17</sub>, CR<sub>17</sub>R<sub>17</sub>-NR' o NR'-CR<sub>17</sub>R<sub>17</sub>; cada R' es H, alquilo o alquilo sustituido;

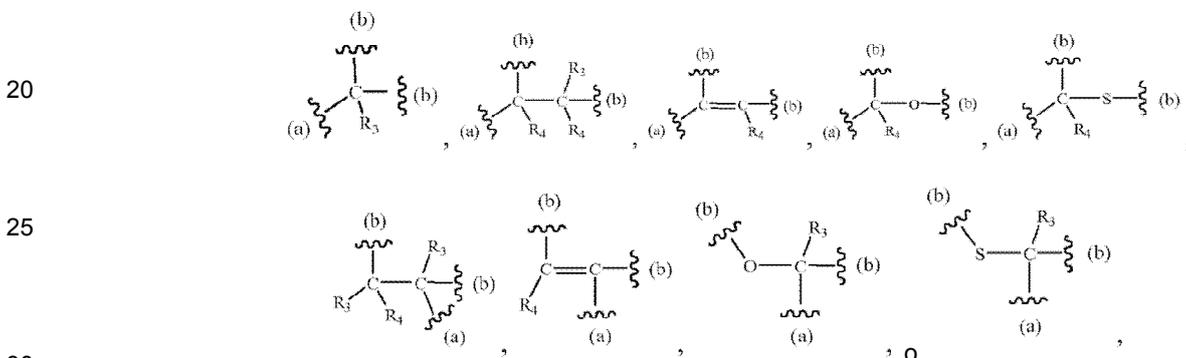
cada Z<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en un enlace, -C(O)-, -C(S)-, alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> opcionalmente sustituido, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> opcionalmente sustituido y heteroalquilo opcionalmente sustituido;

10 cada Z<sub>3</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquileo opcionalmente sustituido, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alqueno opcionalmente sustituido, heteroalquilo opcionalmente sustituido, -O-, -S-, -C(O)-, -C(S)-, y -N(R')-; cada T<sub>3</sub> es un enlace, C (R") (R"), O o S; con la condición de que cuando T<sub>3</sub> es O o S, R" no puede ser halógeno;

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

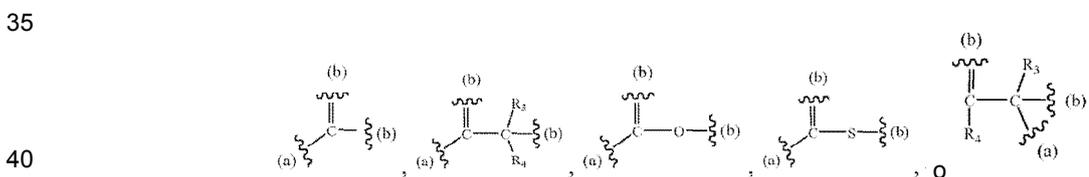
15 m y p son 0, 1, 2 o 3, siempre que al menos uno de m o p no sea 0;

M<sub>2</sub> es



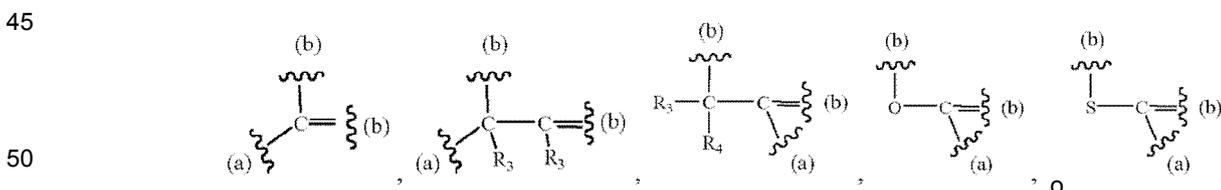
donde (a) indica unión al grupo B y (b) indica unión a posiciones respectivas dentro del grupo heterociclo;

M<sub>3</sub> es



donde (a) indica unión al grupo B y (b) indica unión a posiciones respectivas dentro del grupo heterociclo;

M<sub>4</sub> es



donde (a) indica unión al grupo B y (b) indica unión a posiciones respectivas dentro del grupo heterociclo;

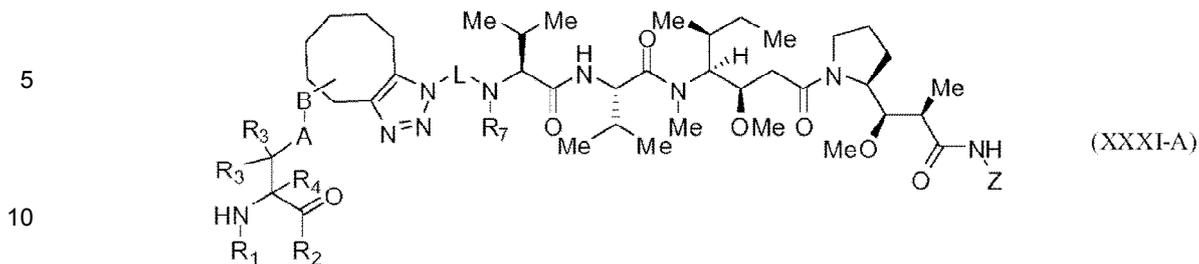
55 cada R<sub>19</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alcoxi, éster, éter, tioéter, aminoalquilo, halógeno, éster alquílico, éster arílico, amida, arilamida, haluro de alquilo, alquilamina, ácido alquilsulfónico, alquilo nitro, tioéster, sulfonilo éster, halosulfonilo, nitrilo, alquilo nitrilo y nitro;

q es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11; y

60 cada R<sub>16</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, NO<sub>2</sub>, CN y alquilo sustituido.

[0318] En algunas divulgaciones, el compuesto de Fórmula (XXXI) incluye compuestos que tienen la estructura de Fórmula (XXXI-A):

65



15 **[0319]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI),  $R_5$  es tiazol o ácido carboxílico. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI),  $R_6$  es H. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI), Ar es fenilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI),  $R_7$  es metilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI), n es un número entero de 0 a 20. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI), n es un número entero de 0 a 10. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI), n es un número entero de 0 a 5.

25 **[0320]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI),  $R_5$  es tiazol o ácido carboxílico. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI),  $R_5$  es hidrógeno. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI),  $R_5$  es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas divulgaciones de los compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI),  $R_5$  es -NH-(alquileo-O) $_n$ -NH $_2$ , donde alquileo es -CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ -, o -CH $_2$ CH $_2$ -. En ciertas descripciones de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI), el alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno.

35 **[0321]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI),  $R_5$  es -NH-(alquileo-O) $_n$ -NH $_2$ , en donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100

40 **[0322]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI),  $R_6$  es H. En algunas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI),  $R_6$  es hidroxilo.

45 **[0323]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI), Ar es fenilo.

50 **[0324]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI),  $R_7$  es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI),  $R_7$  es hidrógeno.

55 **[0325]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI), cada L, L $_1$ , L $_2$ , L $_3$  y L $_4$  es independientemente escindible enlazador o enlazador no escindible. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI), cada L, L $_1$ , L $_2$ , L $_3$  y L $_4$  es independientemente un enlazador derivatizado de oligo(etilenglicol).

60 **[0326]** En ciertas descripciones de los compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI), cada alquileo, alquileo', alquileo'' y alquileo''' es independientemente -CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ -, -CH $_2$ CH $_2$ -, o -CH $_2$ CH $_2$ -. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI), alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno.

65 **[0327]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI),

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

**[0328]** En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI), R<sub>1</sub> es un polipéptido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI), R<sub>2</sub> es un polipéptido. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI), el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas divulgaciones de compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI), el anticuerpo es herceptin.

**[0329]** Los compuestos de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV), o (XXXVI) se pueden formar mediante la alquilación reductiva de compuestos de amina aromática con reactivos que contienen carbonilo tales como, por vía de ejemplo, cetonas, ésteres, tioésteres y aldehídos.

**[0330]** La formación de dichos derivados de dolastatina unidos a heterociclo de aminoácidos no naturales que tienen la estructura de Fórmula (XXXI), (XXXII), (XXXIII), (XXXIV), (XXXV) o (XXXVI) incluye, pero está no limitado a, (i) reacciones de aminoácidos no naturales que contienen diaminas con derivados unidos a dolastatina que contienen dicarbonilo o reacciones de aminoácidos no naturales que contienen diamina con derivados unidos a dolastatina que contienen cetoalquinas, (ii) reacciones de dicarbonilo que contienen aminoácidos no naturales con derivados unidos a dolastatina que contienen diamina o reacciones de aminoácidos no naturales que contienen dicarbonilo con derivados unidos a dolastatina que contienen cetoamina, (iii) reacciones de aminoácidos no naturales que contienen cetoalquina con diamina que contienen derivados ligados a dolastatina, o (iv) reacciones de aminoácidos no naturales que contienen cetoamina con v que contiene dicarbonilo.

**[0331]** La modificación de los derivados unidos a dolastatina descritos en la presente memoria con tales reacciones tiene cualquiera o todas de las siguientes ventajas. En primer lugar, las diaminas sufren condensación con compuestos que contienen dicarbonilo en un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 (y en realizaciones adicionales en un intervalo de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, en otras realizaciones en un intervalo de pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, en otras realizaciones en un intervalo de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9, y en realizaciones adicionales un intervalo de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9, en otras realizaciones un pH de aproximadamente 4, y en otra realización más un pH de aproximadamente 8) para generar heterociclo, que incluye un heterociclo que contiene nitrógeno, enlaces. Bajo estas condiciones, las cadenas laterales de los aminoácidos naturales son no reactivas. En segundo lugar, tal química selectiva hace posible la derivatización específica de sitio de las proteínas recombinantes: las proteínas derivadas pueden prepararse ahora como productos homogéneos definidos. En tercer lugar, las condiciones leves necesarias para efectuar la reacción de las diaminas descritas aquí con los polipéptidos que contienen dicarbonilo descritos en la presente memoria generalmente no destruyen irreversiblemente la estructura terciaria del polipéptido (excepto, por supuesto, cuando el propósito de la reacción es destruir tales estructura terciaria). En cuarto lugar, la reacción se produce rápidamente a temperatura ambiente, lo que permite el uso de muchos tipos de polipéptidos o reactivos que serían inestables a temperaturas más altas. En quinto lugar, la reacción se produce fácilmente en condiciones acuosas, permitiendo de nuevo el uso de polipéptidos y reactivos incompatibles (en cualquier medida) con soluciones no acuosas. Seis, la reacción se produce fácilmente incluso cuando la relación de polipéptido o aminoácido a reactivo es estequiométrica, casi estequiométrica o de tipo estequiométrico, de modo que no es necesario añadir un exceso de reactivo o polipéptido para obtener una cantidad útil de producto de reacción. Séptimo, el heterociclo resultante se puede producir regioselectivamente y/o regiospecíficamente, dependiendo del diseño de porciones de diamina y dicarbonilo de los reactivos. Finalmente, la condensación de diaminas con moléculas que contienen dicarbonilo genera heterociclo, que incluye un heterociclo que contiene nitrógeno, enlaces que son estables en condiciones biológicas.

#### **VI. Ubicación de aminoácidos no naturales en derivados de enlazador de dolastatina**

**[0332]** Los métodos y composiciones descritas en este documento incluyen la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en un derivado enlazador de dolastatina. Se pueden incorporar uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones particulares que no interrumpen la actividad del derivado enlazador de dolastatina. Esto se puede lograr haciendo sustituciones "conservadoras", que incluyen, entre otras, la sustitución de aminoácidos hidrófobos por aminoácidos hidrófobos no naturales o naturales, aminoácidos voluminosos con aminoácidos voluminosos no naturales o naturales, aminoácidos hidrófilos con aminoácidos hidrófilos no naturales o naturales) y/o insertar el aminoácido no natural en un lugar que no se requiere para la actividad.

**[0333]** Se puede emplear una variedad de enfoques bioquímicos y estructurales para seleccionar los sitios deseados para la sustitución con un aminoácido no natural dentro del derivado enlazador de dolastatina. En algunas divulgaciones, el aminoácido no natural está enlazado en el extremo C del derivado de dolastatina. En otras descripciones, el aminoácido no natural está unido en el extremo N del derivado de dolastatina. Cualquier posición del derivado enlazador de dolastatina es adecuada para la selección para incorporar un aminoácido no natural, y la selección puede basarse en un diseño racional o mediante selección aleatoria para cualquier o ningún propósito

particular deseado. La selección de sitios deseados puede basarse en producir un polipéptido de aminoácido no natural (que puede modificarse adicionalmente o permanecer sin modificar) que tiene cualquier propiedad o actividad deseada, que incluye, pero no se limita a, moduladores de unión a receptor, moduladores de actividad de receptor, moduladores de unión aglutinantes asociados, moduladores de la actividad asociada de unión, moduladores de conformación de pareja de unión, formación de dímeros o multímeros, sin cambio de actividad o propiedad en comparación con la molécula nativa, o manipulación de cualquier propiedad física o química del polipéptido tal como solubilidad, agregación o estabilidad. Alternativamente, los sitios identificados como críticos para la actividad biológica también pueden ser buenos candidatos para la sustitución con un aminoácido no natural, de nuevo dependiendo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Otra alternativa sería simplemente hacer sustituciones en serie en cada posición en la cadena polipeptídica con un aminoácido no natural y observar el efecto sobre las actividades del polipéptido. Cualquier medio, técnica o método para seleccionar una posición para la sustitución con un aminoácido no natural en cualquier polipéptido es adecuado para uso en los métodos, técnicas y composiciones descritas en este documento.

**[0334]** La estructura y actividad de los mutantes de origen natural de un polipéptido que contienen deleciones también se pueden examinar para determinar las regiones de la proteína que probablemente sean tolerantes a la sustitución con un aminoácido no natural. Una vez que se han eliminado los residuos que probablemente sean intolerantes a la sustitución con aminoácidos no naturales, se puede examinar el impacto de las sustituciones propuestas en cada una de las posiciones restantes usando métodos que incluyen, pero no se limitan a la estructura tridimensional de los aminoácidos. polipéptido relevante, y cualquier ligando o proteína de unión asociada. Las estructuras de rayos X y cristalografía de muchos polipéptidos están disponibles en Protein Data Bank (PDB, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), una base de datos centralizada que contiene datos estructurales tridimensionales de moléculas grandes de proteínas y ácidos nucleicos, se puede usar para identificar posiciones de aminoácidos que pueden sustituirse con aminoácidos no naturales. Además, se pueden hacer modelos que investiguen la estructura secundaria y terciaria de los polipéptidos, si no se dispone de datos estructurales tridimensionales. Por lo tanto, la identidad de las posiciones de aminoácidos que pueden estar sustituidas con aminoácidos no naturales se puede obtener fácilmente.

**[0335]** Los sitios ilustrativos de incorporación de un aminoácido no natural incluyen, pero no se limitan a, aquellos que están excluidos de las regiones potenciales de unión al receptor, o las regiones para unirse a las proteínas o ligandos de unión pueden estar total o parcialmente expuestos al disolvente, tienen las interacciones mínimas o nulas con enlaces de hidrógeno con residuos cercanos, pueden exponerse mínimamente a residuos reactivos cercanos, y/o pueden estar en regiones que son altamente flexibles según lo predicho por la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido particular con su receptor asociado, ligando o proteínas de unión.

**[0336]** Una amplia variedad de aminoácidos no naturales puede sustituirse, o incorporarse en una posición dada en un polipéptido. A modo de ejemplo, se puede seleccionar un aminoácido no natural particular para incorporación basado en un examen de la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido con su ligando, receptor y/o proteínas de unión asociadas, una preferencia por sustituciones conservativas

**[0337]** En una descripción, los métodos descritos en este documento incluyen la incorporación en el derivado enlazador de dolastatina, donde el derivado enlazador de dolastatina comprende un primer grupo reactivo; y poner en contacto el derivado enlazador de dolastatina con una molécula (que incluye, pero no se limita a, una segunda proteína o polipéptido o análogo polipeptídico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y cualquier combinación de los mismos) que comprende un segundo grupo reactivo. En ciertas divulgaciones, el primer grupo reactivo es un resto hidroxilamina y el segundo grupo reactivo es un resto carbonilo o dicarbonilo, por lo que se forma un enlace oxima. En ciertas divulgaciones, el primer grupo reactivo es un resto carbonilo o dicarbonilo y el segundo grupo reactivo es un resto hidroxilamina, por lo que se forma un enlace oxima. En ciertas divulgaciones, el primer grupo reactivo es un resto carbonilo o dicarbonilo y el segundo grupo reactivo es un resto oxima, por lo que se produce una reacción de intercambio de oxima. En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo es un resto oxima y el segundo grupo reactivo es un resto carbonilo o dicarbonilo, por lo que se produce una reacción de intercambio de oxima.

**[0338]** En algunos casos, la(s) incorporación(es) del derivado de dolastatina se combinarán con otras adiciones, sustituciones o deleciones dentro del polipéptido para afectar otros rasgos químicos, físicos, farmacológicos y/o biológicos. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la estabilidad (incluyendo, entre otros, resistencia a la degradación proteolítica) del polipéptido o para aumentar la afinidad del polipéptido por su receptor apropiado, ligando y/o proteínas de unión. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o deleciones pueden aumentar la solubilidad (que incluye, pero no se limita a, cuando se expresa en *E. coli* u otras células hospedadoras) del polipéptido. En algunas divulgaciones, los sitios se seleccionan para la sustitución con un aminoácido natural codificado o no natural además de otro sitio para la incorporación de un aminoácido no natural con el fin de aumentar la solubilidad del polipéptido después de la expresión en *E. coli* u otras células huésped recombinantes. En algunas divulgaciones, los polipéptidos comprenden otra adición, sustitución o deleción que modula la afinidad por el ligando asociado, proteínas de unión, y/o receptor, modula (incluyendo pero no se limita a, aumenta o disminuye) la dimerización del receptor, estabiliza los dímeros del receptor, modula la vida media circulante, modula la liberación o biodisponibilidad, facilita la purificación o mejora o altera una vía particular de administración. De forma similar, el polipéptido de aminoácido no natural puede comprender secuencias de

escisión química o enzimática, secuencias de escisión de proteasa, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpo (que incluyen pero no se limitan a, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (incluyendo pero no limitado a, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas unidas (que incluyen pero no se limitan a, biotina) que mejoran la detección (incluyendo pero no se limitan a GFP), purificación, transporte a través de tejidos o membranas celulares, liberación de profármaco o activación, reducción de tamaño u otros rasgos del polipéptido.

### VII. Gen Her2 como ejemplar

**[0339]** Los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en este documento no están limitados a un tipo, clase o familia particular de polipéptidos o proteínas. De hecho, virtualmente cualquier polipéptido puede diseñarse o modificarse para incluir al menos un aminoácido no natural "modificado o no modificado" que contiene un derivado enlazador de dolastatina descrito en este documento. A modo de ejemplo solamente, el polipéptido puede ser homólogo a una proteína terapéutica seleccionada del grupo que consiste en: alfa-1 antitripsina, angiostatina, factor antihemolítico, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, anticuerpo monoclonal (por ejemplo, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, infliximab, adalimumab, basiliximab, daclizumab, omalizumab, ustekinumab, etanercept, gemtuzumab, alemtuzumab, rituximab, trastuzumab, nimotuzumab, palivizumab y abciximab), apolipoproteína, apoproteína, factor natriurético atrial, polipéptido natriurético atrial, péptido auricular, quimiocina CXC, T39765, NAP-2, ENA-78, gro-a, gro-b, gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG, calcitonina, ligando c-kit, citocina, Quimiocina CC, proteína quimioatrayente monocítica-1, proteína-2 quimioattractante de monocitos, proteína-3 quimioattractante de monocitos, proteína-1 alfa inflamatoria de monocitos, proteína-i beta inflamatoria de monocitos, RANTES, 1309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262, CD40, ligando CD40, ligando c-kit, colágeno, colonia st factor de imulación (CSF), factor del complemento 5a, inhibidor del complemento, receptor del complemento 1, citoquina, péptido activador de los neutrófilos 78, MIP-16, MCP-1, factor de crecimiento epidérmico (EGF), péptido activador de los neutrófilos epiteliales, eritropoyetina (EPO), toxina exfoliante, Factor IX, Factor VII, Factor VIII, Factor X, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), fibrinógeno, fibronectina, proteína del paquete de cuatro hélices, G-CSF, glp-1, GM-CSF, glucocerebrosidasa, gonadotropina, factor de crecimiento, receptor del factor de crecimiento, grf, proteína hedgehog, hemoglobina, factor de crecimiento de hepatocitos (hGF), hirudina, hormona de crecimiento humano (hGH), albúmina sérica humana, ICAM-1, receptor ICAM-1, receptor LFA-1, LFA-1, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), IGF-I, IGF-II, interferón (IFN), IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, interleucina (IL), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), lactoferrina, factor inhibitorio de la leucemia, luciferasa, neurturina, inhibidor de neutrófilos factor (NIF), oncostatina M, proteína osteogénica, producto oncogénico, paracitonina, hormona paratiroidea, PD-ECSF, PDGF, hormona peptídica, pleiotropina, proteína A, proteína G, pth, exotoxina pirogénica A, exotoxina pirogénica B, exotoxina pirogénica C, pyy, relaxina, renina, SCF, pequeña proteína biosintética, receptor I del complemento soluble, I-CAM 1 soluble, receptor de interleuquina soluble, receptor de TNF soluble, somatomedina, somatostatina, somatotropina, estreptoquinasa, superantígenos, enterotoxina estafilocócica, SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, VER, receptor de hormona esteroidea, dismutasa superóxida, toxina del síndrome de choque tóxico, timosina alfa 1, activador del plasminógeno tisular, factor de crecimiento tumoral (TGF), factor de necrosis tumoral, factor de necrosis tumoral alfa, factor de necrosis tumoral beta, receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), proteína VLA-4, proteína VCAM-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), uroquinasa, mos, ras, raf, met, p53, tat, fos, myc, jun, myb, rel, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, receptor de testosterona, receptor de aldosterona, receptor de LDL y corticosterona.

**[0340]** En una divulgación, se describe un método para tratar tumores sólidos que sobreexpresa HER-2 seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, carcinoma de pulmón de células pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma gástrico, cáncer de cuello uterino, carcinoma esofágico y cáncer de colon. En otra descripción, el tumor sólido es cáncer de mama. En un discurso adicional, el tumor sólido es cáncer de ovario.

**[0341]** Por lo tanto, la siguiente descripción de trastuzumab se proporciona con fines ilustrativos y solo a modo de ejemplo, y no como un límite en el alcance de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en este documento. Además, la referencia a trastuzumab en esta aplicación tiene como objetivo usar el término genérico como ejemplo de cualquier anticuerpo. Por lo tanto, se entiende que las modificaciones y las químicas descritas en la presente memoria con referencia a trastuzumab pueden aplicarse igualmente a cualquier anticuerpo o anticuerpo monoclonal, incluidos los específicamente enumerados aquí.

**[0342]** Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al dominio IV del segmento extracelular del receptor Her2/neu. El gen Her2 (también conocido como gen Her2/neu y ErbB2) se amplifica en 20-30% de cánceres de mama de etapa temprana, lo que lo sobreexpresa. Además, en el cáncer, Her2 puede enviar señales sin la llegada de mitógenos y unirse a cualquier receptor, lo que lo hace hiperactivo.

**[0343]** Her2 se extiende a través de la membrana celular y transporta señales desde el exterior de la célula hacia el interior. En personas sanas, los compuestos de señalización llamados mitógenos llegan a la membrana celular y se unen a la parte externa de otros miembros de la familia de receptores HER. Esos receptores unidos se unen (dimerizan) con Her2, activándolo. Her2 luego envía una señal al interior de la célula. La señal pasa a través de diferentes rutas bioquímicas. Esto incluye la vía PI3K/Akt y la vía MAPK. Estas señales promueven la invasión, la supervivencia y el crecimiento de los vasos sanguíneos (angiogénesis) de las células.

[0344] Las células tratadas con trastuzumab se detienen durante la fase G1 del ciclo celular por lo que hay una proliferación reducida. Se ha sugerido que el trastuzumab induce parte de su efecto por la regulación negativa de Her2/neu que conduce a la interrupción de la dimerización del receptor y la señalización a través de la cascada de PI3K aguas abajo. P27Kip1 no está fosforilado y puede ingresar al núcleo e inhibir la actividad de cdk2, lo que provoca la detención del ciclo celular. Además, trastuzumab suprime la angiogénesis por la inducción de factores antiangiogénicos y la represión de los factores proangiogénicos. Se cree que una contribución al crecimiento no regulado observado en el cáncer podría deberse a la segmentación proteolítica de Her2/neu que da como resultado la liberación del dominio extracelular. Se ha demostrado que el trastuzumab inhibe la escisión del ectodominio de Her2/neu en células de cáncer de mama.

#### VIII. Absorción celular de aminoácidos no naturales

[0345] La absorción de aminoácidos no naturales por una célula eucariótica es un problema que se considera típicamente cuando se diseñan y seleccionan aminoácidos no naturales, que incluyen, pero no se limitan a, la incorporación a una proteína. Por ejemplo, la alta densidad de carga de los  $\alpha$ -aminoácidos sugiere que es poco probable que estos compuestos sean permeables a las células. Los aminoácidos naturales se incorporan a la célula eucariota a través de una colección de sistemas de transporte basados en proteínas. Se puede realizar una detección rápida que evalúa qué aminoácidos no naturales, si es que hay alguno, son captados por las células (ejemplos 15 y 16 son ejemplos ilustrativos de pruebas no limitativas que se pueden realizar con aminoácidos no naturales). Véase, por ejemplo, los ensayos de toxicidad en, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/198637 titulada "Protein Arrays", y Liu, DR & Schultz, PG (1999). Progreso hacia la evolución de un organismo con un código genético expandido. PNAS United States 96: 4780-4785. Aunque la captación se analiza fácilmente con varios ensayos, una alternativa al diseño de aminoácidos no naturales que son susceptibles de captación celular consiste en proporcionar vías biosintéticas para crear aminoácidos *in vivo*.

[0346] Típicamente, el aminoácido no natural producido a través de la absorción celular como se describe en la presente memoria se produce en una concentración suficiente para una biosíntesis de proteínas eficaz, que incluye, pero no se limita a, una cantidad celular natural, pero no en un grado tal que afecta la concentración de otros aminoácidos o agota los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas de esta manera son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM.

#### IX. Biosíntesis de aminoácidos no naturales

[0347] Ya existen muchas rutas biosintéticas en células para la producción de aminoácidos y otros compuestos. Si bien un método biosintético para un aminoácido no natural particular puede no existir en la naturaleza, que incluye pero no se limita a, en una célula, los métodos y composiciones descritas en la presente proporcionan tales métodos. Por ejemplo, las rutas biosintéticas para aminoácidos no naturales se pueden generar en la célula hospedadora mediante la adición de nuevas enzimas o la modificación de las rutas de células hospedadoras existentes. Las nuevas enzimas adicionales incluyen enzimas naturales o enzimas desarrolladas artificialmente. Por ejemplo, la biosíntesis de p-aminofenilalanina (como se presenta en un ejemplo en el documento WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of unnatural amino acids") se basa en la adición de una combinación de enzimas conocidas de otros organismos. Los genes para estas enzimas se pueden introducir en una célula eucariota transformando la célula con un plásmido que comprende los genes. Los genes, cuando se expresan en la célula, proporcionan una ruta enzimática para sintetizar el compuesto deseado. Ejemplos de los tipos de enzimas que se añaden opcionalmente se proporcionan en este documento. Secuencias de enzimas adicionales se encuentran, por ejemplo, en Genbank. Las enzimas desarrolladas artificialmente se pueden agregar a una célula de la misma manera. De esta manera, la maquinaria celular y los recursos de una célula se manipulan para producir aminoácidos no naturales.

[0348] Se encuentran disponibles una variedad de métodos para producir enzimas novedosas para uso en rutas biosintéticas o para la evolución de rutas existentes. Por ejemplo, la recombinación recursiva, que incluye pero no se limita a, tal como fue desarrollada por Maxygen, Inc. (disponible en la World Wide Web en [www.maxygen.com](http://www.maxygen.com)), puede usarse para desarrollar nuevas enzimas y vías. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, Nature 370 (4): 389-391; y, Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 91: 10747 - 10751. De forma similar, DesignPath™, desarrollado por Genencor (disponible en la world wide web en [genencor.com](http://genencor.com)) se utiliza opcionalmente para la ingeniería de rutas metabólicas, que incluye, entre otras, la creación de un camino para crear un aminoácido no natural en una célula. Esta tecnología reconstruye las vías existentes en los organismos hospedadores utilizando una combinación de nuevos genes, que incluyen, entre otros, los identificados a través de la genómica funcional, la evolución molecular y el diseño. Diversa Corporation (disponible en la world wide web en [diversa.com](http://diversa.com)) también proporciona tecnología para rastrear rápidamente bibliotecas de genes y vías génicas, que incluyen, pero no se limitan a, crear nuevas rutas para la producción biosintética de aminoácidos no naturales.

[0349] Típicamente, el aminoácido no natural producido con una ruta biosintética diseñada como se describe en la presente memoria se produce en una concentración suficiente para una biosíntesis de proteínas eficaz, que incluye,

pero no se limita a, una cantidad celular natural, pero no en tal grado como para afectar la concentración de otros aminoácidos o agotar los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas *in vivo* de esta manera son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM. Una vez que una célula se transforma con un plásmido que comprende los genes utilizados para producir las enzimas deseadas para una ruta específica y se genera un aminoácido no natural, las selecciones *in vivo* se usan opcionalmente para optimizar aún más la producción del aminoácido no natural tanto para síntesis de proteína ribosomal como crecimiento celular.

**X. Metodología sintética adicional**

**[0350]** Los aminoácidos no naturales descritos en este documento se pueden sintetizar usando metodologías descritas en la técnica o usando las técnicas descritas en este documento o mediante una combinación de las mismas. Como ayuda, la siguiente tabla proporciona varios electrófilos y nucleófilos de partida que se pueden combinar para crear un grupo funcional deseado. La información proporcionada pretende ser ilustrativa y no limitativa de las técnicas sintéticas descritas en este documento.

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

Producto de enlace covalente	Electrófilo	Nucleófilo
Carboxamidas	Ésteres activados	aminas/anilinas
Carboxamidas	azidas de acilo	aminas/anilinas
Carboxamidas	haluros de acilo	aminas/anilinas
Ésteres	haluros de acilo	alcoholes/phenols
Ésteres	nitrilos acílicos	alcoholes/fenoles
Carboxamidas	nitrilos acílicos	aminas/anilinas
Iminas	Aldehídos	aminas/anilinas
Hidrazonas	aldehídos o cetonas	Hidrazinas
Oximas	aldehídos o cetonas	Hidroxilaminas
Aminas de alquilo	haluros de alquilo	aminas/anilinas
Ésteres	haluros de alquilo	ácidos carboxílicos
Tioéteres	haluros de alquilo	Tioles
Éteres	haluros de alquilo	alcoholes/fenoles
Tioéteres	sulfonatos de alquilo	Tioles
Ésteres	sulfonatos de alquilo	ácidos carboxílicos
Éteres	sulfonatos de alquilo	alcoholes/fenoles
Ésteres	AnHidruros	alcoholes/fenoles
Carboxamidas	AnHidruros	aminas/anilinas
Tiofenoles	haluros de arilo	Tioles
Aminas de arilo	haluros de arilo	Aminas
Tioéteres	Azindinas	Tioles
Ésteres de boronato	Boronatos	Glicoles
Carboxamidas	ácidos carboxílicos	aminas/anilinas
Ésteres	ácidos carboxílicos	Alcoholes
Hidrazinas	Hidrazidas	ácidos carboxílicos
N-aculureas o AnHidruros	carbodiimidias	ácidos carboxílicos

	<i>Producto de enlace covalente</i>	Electrófilo	Nucleófilo
5	<i>Ésteres</i>	diazoalcanos	ácidos carboxílicos
	<i>Tioéteres</i>	Epóxidos	Tioles
	<i>Tioéteres</i>	haloacetamidas	Tioles
10	<i>Amotriazinas</i>	halotriazinas	aminas/anilinas
	<i>Éteres de triazinilo</i>	halotriazinas	alcoholes/fenoles
	<i>Amidinas</i>	Ésteres de imido	aminas/anilinas
	<i>Ureas</i>	Isocianatos	aminas/anilinas
15	<i>Uretanos</i>	Isocianatos	alcoholes/fenoles
	<i>Tioureas</i>	isoTiocianatos	aminas/anilinas
	<i>Tioéteres</i>	Maleimidias	Tioles
	<i>Ésteres de fosfito</i>	fosforamiditas	Alcoholes
20	<i>Éteres de sililo</i>	haluros de sililo	Alcoholes
	<i>Aminas de alquilo</i>	Ésteres de sulfonato	aminas/anilinas
	<i>Tioéteres</i>	Ésteres de sulfonato	Tioles
25	<i>Ésteres</i>	Ésteres de sulfonato	ácidos carboxílicos
	<i>Éteres</i>	Ésteres de sulfonato	Alcoholes
30	<i>Sulfonamidas</i>	haluros de sulfonilo	aminas/anilinas
	<i>Ésteres de sulfonato</i>	haluros de sulfonilo	fenoles/alcoholes

[0351] En general, los electrófilos de carbono son susceptibles de ataque por nucleófilos complementarios, que incluyen nucleófilos de carbono, en donde un nucleófilo atacante lleva un par de electrones al electrófilo de carbono para formar un nuevo enlace entre el nucleófilo y el electrófilo de carbono.

[0352] Los ejemplos no limitantes de nucleófilos de carbono incluyen, pero sin limitación, reactivos de alquilo, alqueniilo, arilo y alquinilo de Grignard, organolitio, organozinc, alquilo, alqueniilo, arilo y alquinilo-estaño (organoestananos), reactivos de alquilo, alqueniilo, arilo y alquinilo-borano (organoboranos y organoboronatos); estos nucleófilos de carbono tienen la ventaja de ser cinéticamente estables en agua o disolventes orgánicos polares. Otros ejemplos no limitantes de nucleófilos de carbono incluyen los edulcorantes de fósforo, enol y enolato; estos nucleófilos de carbono tienen la ventaja de ser relativamente fáciles de generar a partir de precursores bien conocidos por los expertos en la técnica de la química orgánica sintética. Los nucleófilos de carbono, cuando se usan junto con electrófilos de carbono, engendran nuevos enlaces carbono-carbono entre el nucleófilo de carbono y el electrófilo de carbono.

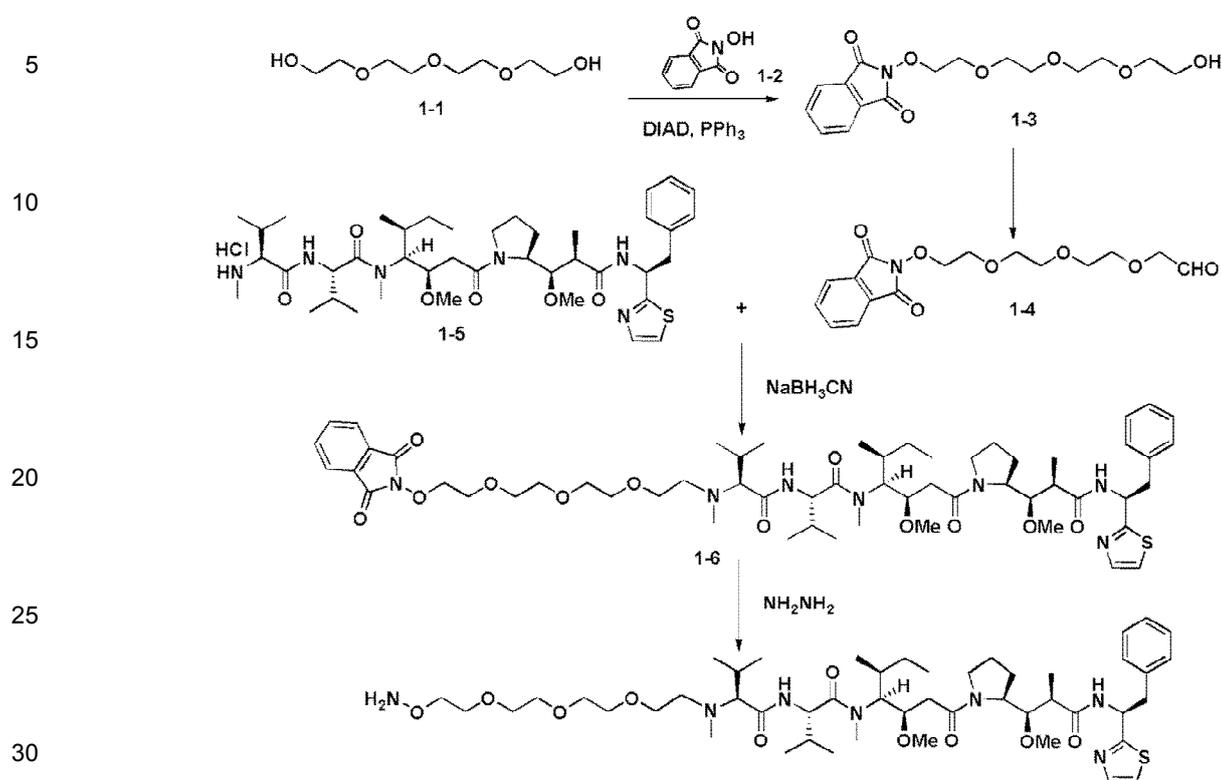
[0353] Los ejemplos no limitantes de nucleófilos no de carbono adecuados para el acoplamiento a electrófilos de carbono incluyen, pero no se limitan a, aminas primarias y secundarias, tioles, tiolatos y tioéteres, alcoholes, alcóxidos, azidas, semicarbazidas y similares. Estos nucleófilos no carbonados, cuando se usan junto con electrófilos de carbono, generan típicamente enlaces heteroátomos (C-X-C), en donde X es un heteroátomo, que incluye, pero no se limita a, oxígeno, azufre o nitrógeno.

## EJEMPLOS

### 55 Ejemplo 1: Síntesis del Compuesto 1

[0354]

Esquema 1



35 **[0355] Compuesto 1-3:** Tetra (etilenglicol) **1-1** (10 g, 51,5 mmol), N-hidroxifitalimida **1-2** (8,4 g, 51,15 mmol) y trifenilfosfina (17,6 g, 67 mmol) se disolvieron en 300 mL de tetrahidrofurano seguido de la adición de DIAD (12,8 mL, 61,78 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 5,47 g (31%) del compuesto **1-3**.

40 **[0356] Compuesto 1-4:** A una solución del compuesto **1-3** (200 mg, 0,59 mmol) en 15 mL de diclorometano se le añadió peryodinato de Dess-Martin (300 mg, 0,71 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se inactivó con la solución de bisulfito sódico en 15 mL de bicarbonato sódico saturado. La mezcla fue separada. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 150 mg (75%) del compuesto **1-4**.

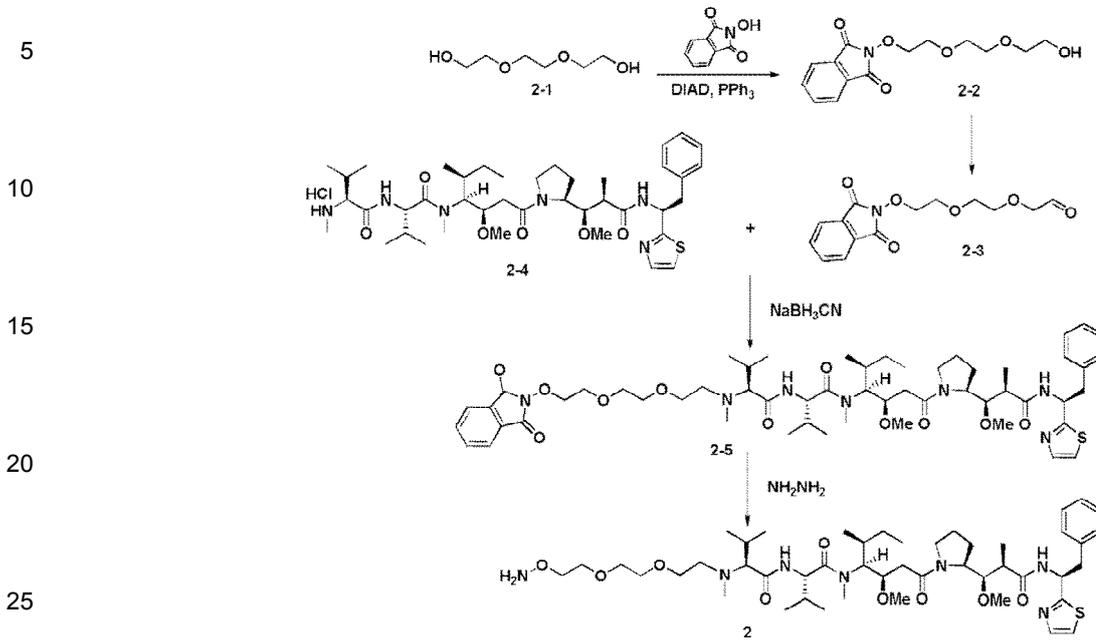
50 **[0357] Compuesto 1-6:** a una solución de sal hidroc্লuro de monometildolastatina **1-5** (50 mg, 0,062 mmol) en 1 mL de DMF se añadieron el compuesto **1-4** (63 mg, 0,186 mmol) y 70  $\mu\text{L}$  de ácido acético, seguido de la adición de 8 mg de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar 60 mg (80%) del compuesto **1-6**. MS (ESI) m/z 547 [M+2H], 1092 [M+H]. 1d.

55 **[0358] Compuesto 1:** Compuesto **1-6** (60 mg, 0,05 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadieron 32 mL de hidrazina. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidroc্লuro de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 33 mg (55%) de compuesto **1**. MS (ESI) m/z 482 [M+2H], 962 [M+H].

### Ejemplo 2: Síntesis del Compuesto 2

60 **[0359]**

Esquema 2

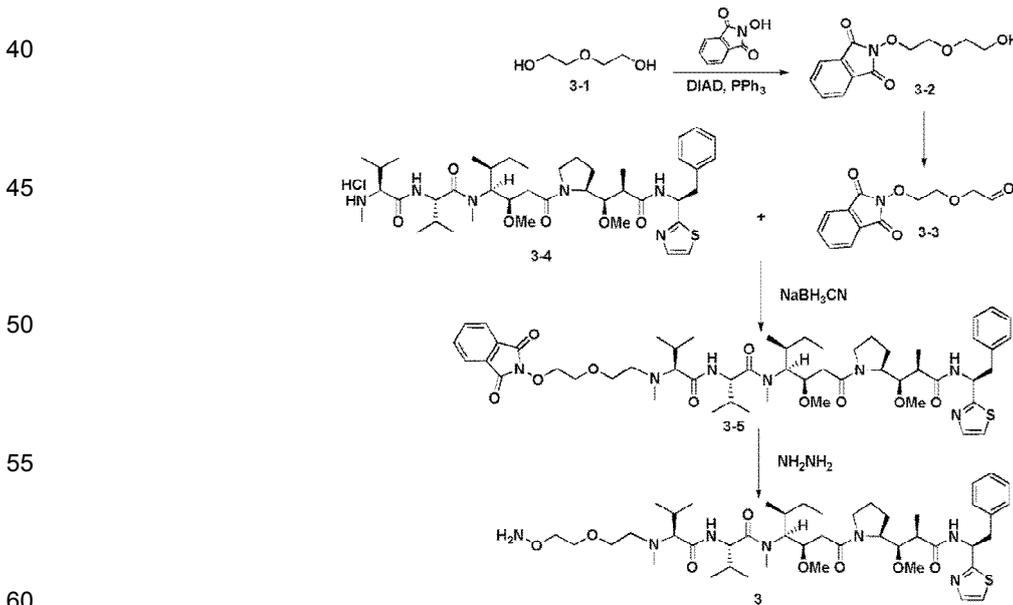


30 **[0360]** El compuesto 2 se sintetizó a través de una ruta sintética similar a la descrita en el Ejemplo 1. MS (ESI) m/z 460 [M+2H], 918 [M+H].

**Ejemplo 3: Síntesis del Compuesto 3**

35 **[0361]**

Esquema 3

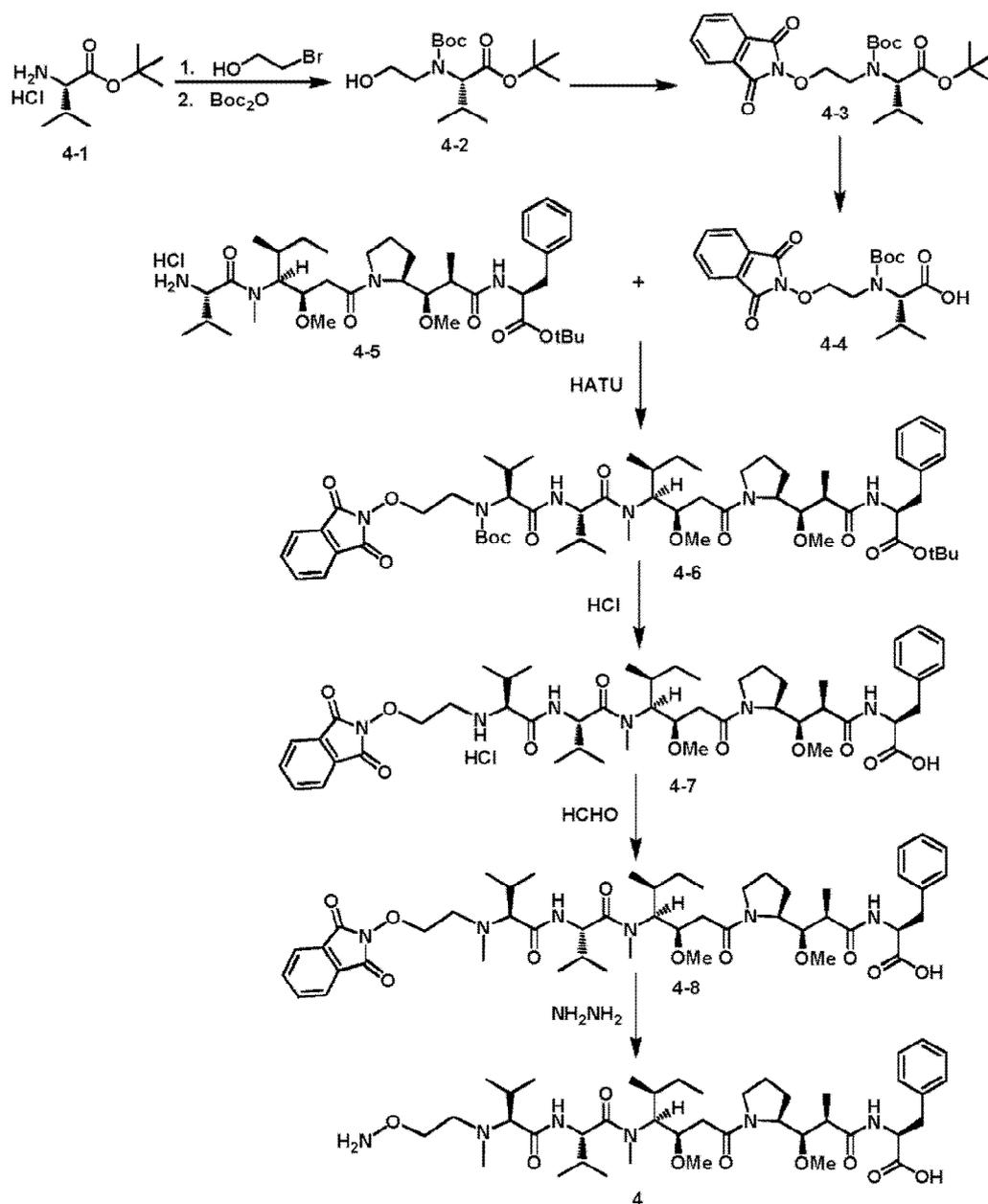


65 **[0362]** El compuesto 3 se sintetizó mediante una ruta sintética similar al Ejemplo 1. MS (ESI) m/z 438 [M+2H], 974 [M+H].

**Ejemplo 4: Síntesis del Compuesto 4**

**[0363] Compuesto 4-2:** a una solución de Val (OtBu)-OH.HCl **4-1** (1 g, 4,77 mmol) y bromoetanol (304,7 ml, 4,3 mmol) en 10 mL de DMF se añadieron 1,68 ml de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. Se añadieron 4,8 mmol de  $\text{Boc}_2\text{O}$  a la mezcla de reacción, seguido de 0,84 mL de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo, y se lavó con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida para dar 0,66 g del compuesto **4-2**.

Esquema 4



**[0364] Compuesto 4-3:** A una solución del compuesto **4-2** (500 mg, 1,58 mmol), se añadió N-hidroxiftalimida (261 mg, 1,6 mmol) y trifetilfosfina (538 mg, 2,05 mmol) en 15 mL de THF DIAD (394 mL, 1,9 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 0,68 g del compuesto **4-3**.

**[0365] Compuesto 4-4:** El compuesto **4-3** se disolvió en 15 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en DMF y se trató con Boc<sub>2</sub>O (230 μL, 1 mmol) y DIEA (352 μL, 2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 100 mg del compuesto **4-4**.

**[0366] Compuesto 4-5:** A una solución de compuesto Boc-Val-Dilo-metilo-Dap-OH en DMF se le agrega phe(OtBu)-OH.HCl, HATU y N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra a vacío y se extrae con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El residuo se purifica por cromatografía ultrarrápida. El compuesto resultante se trata con HCl/EtOAc para dar el compuesto **4-5**.

**[0367] Compuesto 4-6:** A una solución del compuesto **4-5** en DMF se le agrega el compuesto **4-4**, HATU y DIEA. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra a vacío y se extrae con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El residuo se purifica por cromatografía ultrarrápida para dar el compuesto **4-6**.

**[0368] Compuesto 4-7:** El compuesto **4-6** se disuelve en 15 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentra a vacío para dar el compuesto **4-7**.

**[0369] Compuesto 4-8:** A una solución del compuesto **4-7** en 1 mL de DMF se le agrega formaldehído y ácido acético, seguido de la adición de cianoborohidruro sódico. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluye con agua y se purifica por HPLC para dar el compuesto **4-8**.

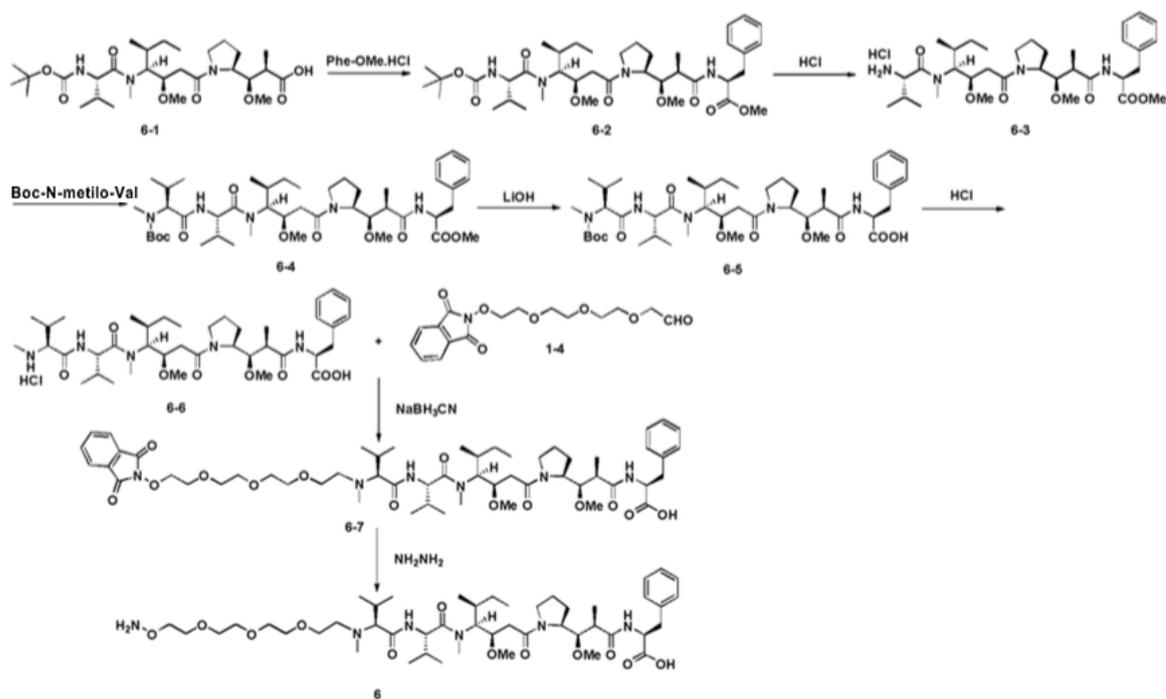
**[0370] Compuesto 4:** El compuesto **4-8** se disuelve en 1 mL de DMF. Se agrega hidrazina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se interrumpe con una solución de hidrocloreuro de IN. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el Compuesto **4**.

#### Ejemplo 5: Síntesis del Compuesto 5

**[0371]** El compuesto **4-7** se disuelve en 1 mL de DMF. Se agrega hidrazina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se interrumpe con una solución de hidrocloreuro de IN. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el Compuesto **5**.

#### Ejemplo 6: Síntesis del Compuesto 6

**[0372]**



**[0373] Compuesto 6-2:** A una solución del compuesto **6-1** (500 mg, 0,875 mmol) en 3 mL de DMF se añadieron 283 mg de hidrocloreuro de fenilalanina, 433 mg de HATU y 581  $\mu$ L de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida para dar 560 mg (76%) del compuesto **6-2**.

[0374] **Compuesto 6-3:** El compuesto **6-2** se disolvió en 15 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró a vacío para dar 511 mg de compuesto **6-3**.

5 [0375] **Compuesto 6-4:** A una solución del compuesto **6-3** (368 mg, 0,55 mmol) en 3 mL de DMF se añadieron 255 mg de Boc-N-metilo valina, 314 mg de HATU y 303  $\mu$ L de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL de X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida para dar 370 mg (79%) del compuesto **6-4**.

10 [0376] **Compuesto 6-5:** A una solución del compuesto **6-4** (170 mg) en 10 mL de MeOH se añadieron 5eq de IN LiOH. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con 1NHCl y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío para dar 150 mg (90%) del compuesto **6-5**.

15 [0377] **Compuesto 6-6:** El compuesto **6-5** se disolvió en 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío y se purificó por HPLC para dar 150 mg del compuesto **6-6**.

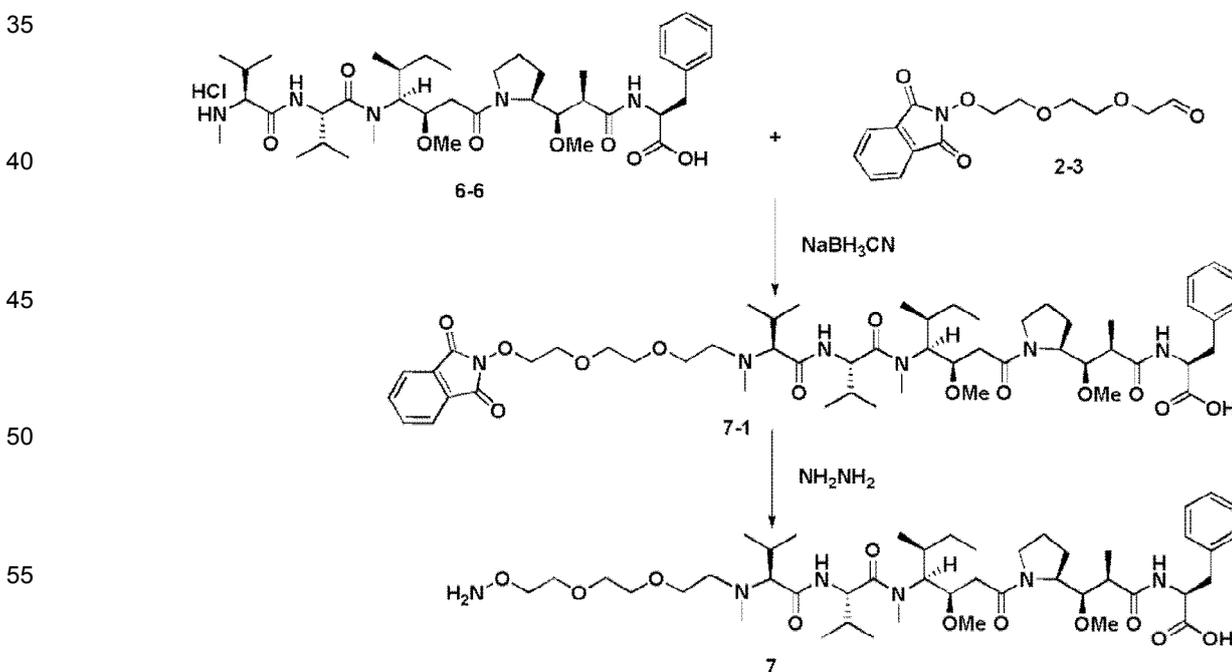
20 [0378] **Compuesto 6-7:** A una solución del compuesto **6-6** (50 mg, 0,062 mmol) en 1 mL de DMF se añadieron el compuesto **1-4** (63 mg, 0,186 mmol) y 70  $\mu$ L de ácido acético, seguido de la adición de 8 mg de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar 60 mg (80%) del compuesto **6-7**.

25 [0379] **Compuesto 6:** Compuesto **6-7** (60 mg, 0,05 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadieron 32 mL de hidrazina. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidrocloreto de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 33 mg (55%) del Compuesto **6**.

#### Ejemplo 7: Síntesis del Compuesto 7

30 [0380]

Esquema 7



[0381] El compuesto **7** se sintetizó a través de una ruta sintética similar al Compuesto **1**. MS (ESI) m/z 440 [M+2H]<sup>+</sup>, 879 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Ejemplo 8: Síntesis del Compuesto 8

65

[0382]

Esquema 8

5

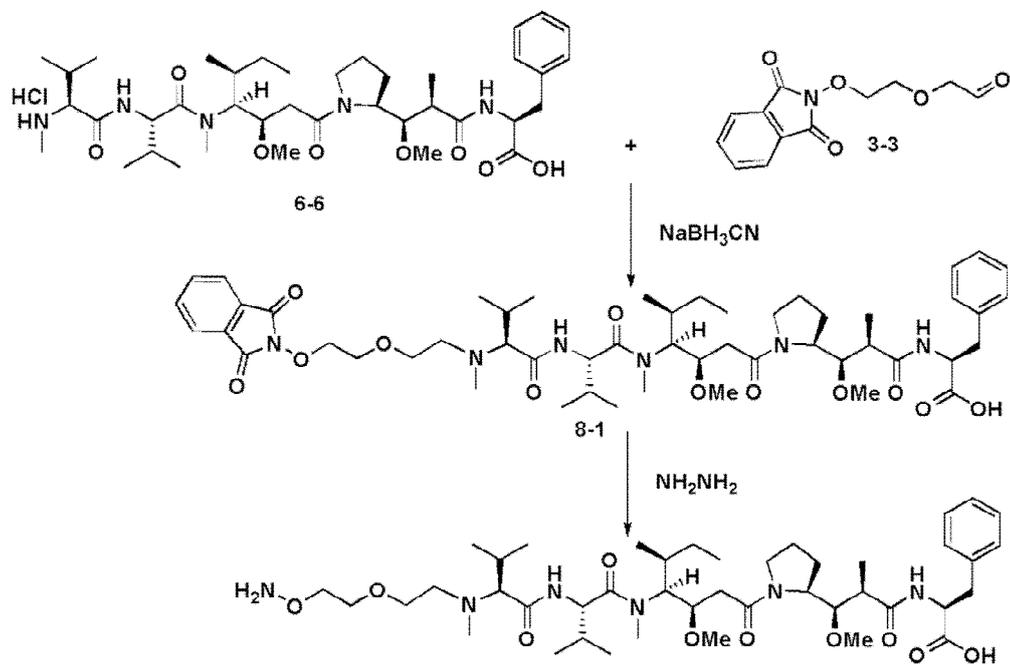
10

15

20

25

30



35

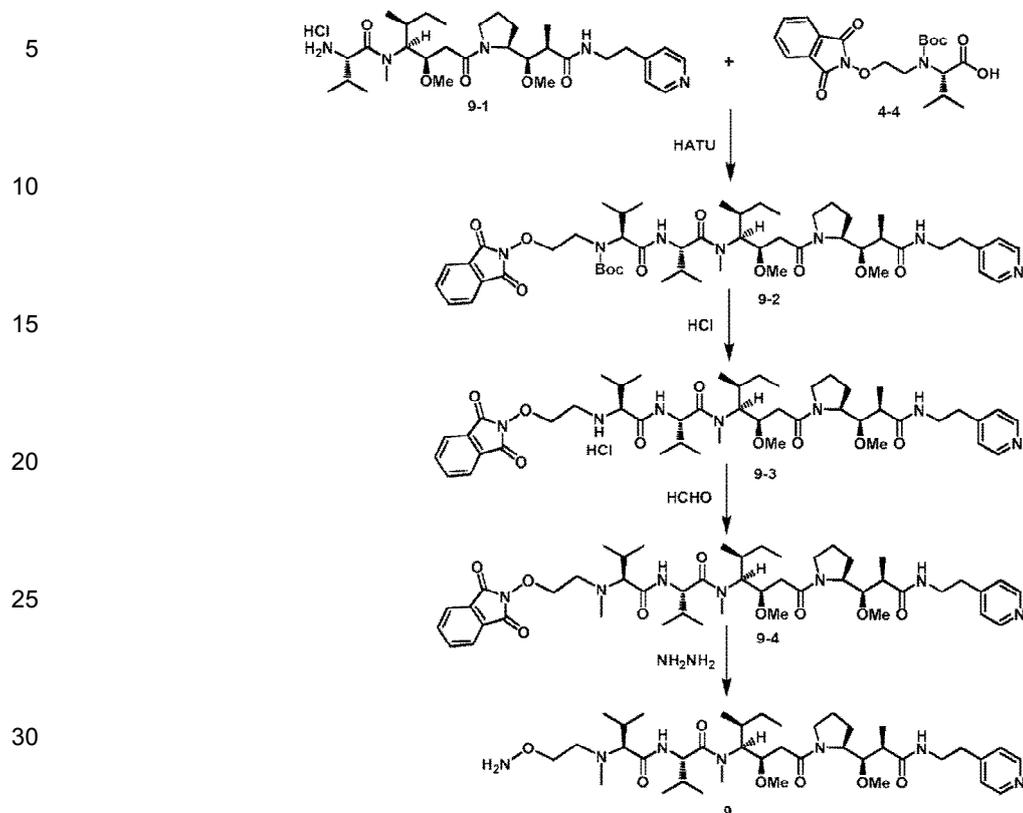
[0383] El compuesto 8 se sintetizó a través de una ruta sintética similar al Compuesto 1. MS (ESI) m/z 418 [M+2H], 835 [M+H].

#### Ejemplo 9: Síntesis del Compuesto 9

40

[0384]

Esquema 9



35

40 [0385] **Compuesto 9-1:** A una solución del compuesto Boc-Val-Dilo-metilo-Dap-OH en DMF se le añade 4-(2-aminoetilo)piridina, HATU y N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra a vacío y se extrae con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL de X2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía flash. El compuesto resultante se trata con HCl/EtOAc para dar el compuesto **9-1**.

45 [0386] **Compuesto 9-2:** A una solución del compuesto **9-1** en DMF se le agrega el compuesto **4-4**, HATU y DIEA. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra a vacío y se extrae con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL de X2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El residuo se purifica por cromatografía ultrarrápida para dar el compuesto **9-2**.

50 [0387] **Compuesto 9-3:** el Compuesto **9-2** se disuelve en 15 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentra a vacío para dar el compuesto **9-3**.

55 [0388] **Compuesto 9-4:** A una solución del compuesto **9-3** en 1 mL de DMF se le agrega formaldehído y ácido acético, seguido de la adición de cianoborohidruro sódico. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluye con agua y se purifica por HPLC para dar el compuesto **9-4**.

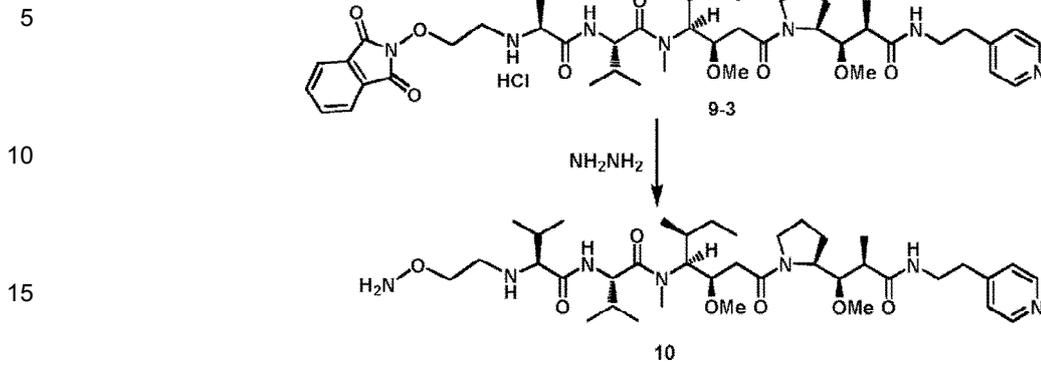
60 [0389] **Compuesto 9:** El Compuesto **9-4** se disuelve en 1 mL de DMF. Se agrega hidrazina La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se interrumpe con una solución de hidrocloreuro de IN. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el compuesto **9**.

#### 60 **Ejemplo 10: Síntesis del Compuesto 10**

[0390]

65

Esquema 10

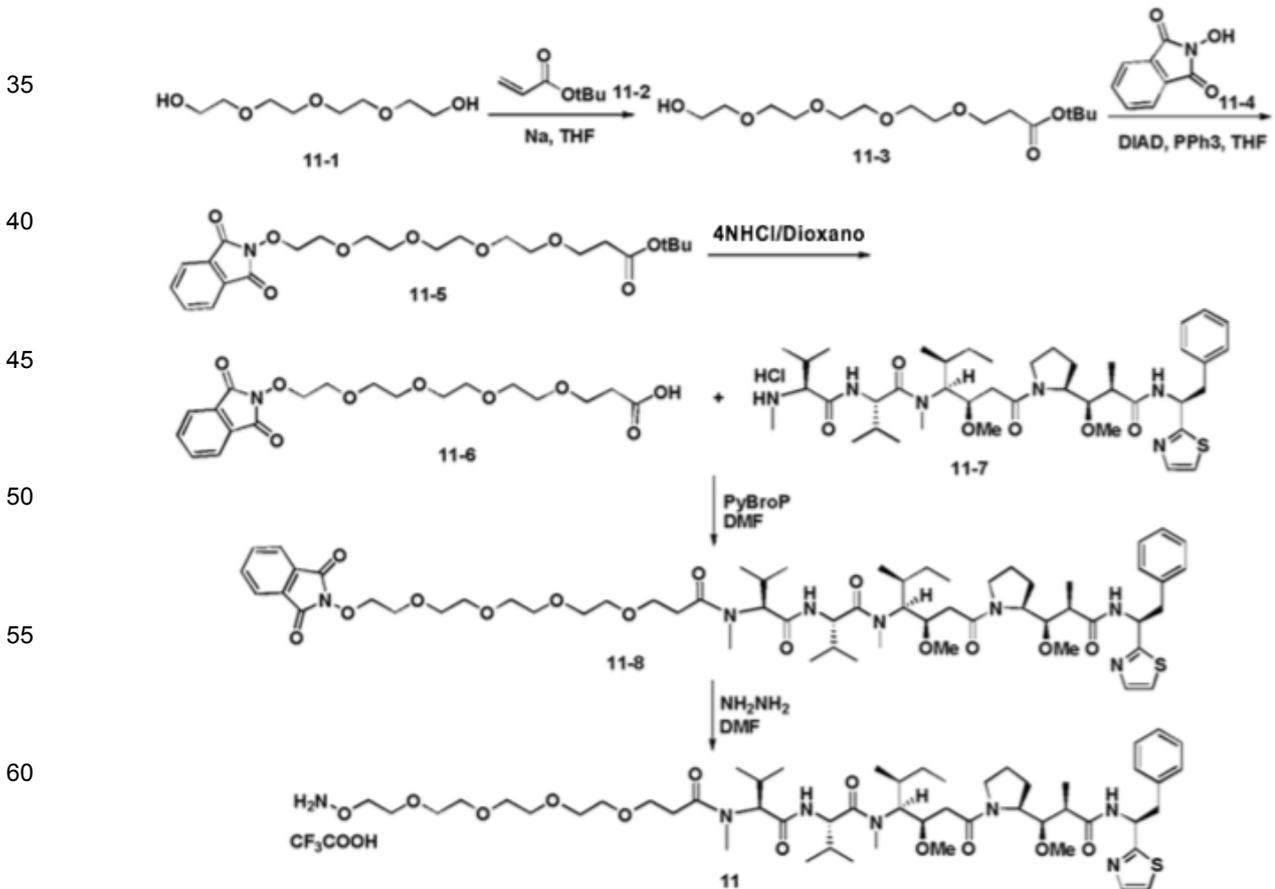


20 **[0391] Compuesto 10:** El Compuesto **9-3** se disuelve en 1 mL de DMF. Se agrega hidrazina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se interrumpe con una solución de hidrócloruro de IN. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el Ejemplo 10.

25 **Ejemplo 11: Síntesis del Compuesto 11**

**[0392]**

Esquema 11



**[0393] Compuesto 11-3:** A una solución de tetra (etilenglicol) **11-1** (40,6 ml, 235 mmol) en 100 mL de tetrahidrofurano se añadieron 47 mg de sodio. Se añadieron 12 mL de acrilato de terc-butilo después de disolver el sodio. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se inactivó con 2 mL de 1 N HCl. El residuo se suspendió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo (100 ml X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío para dar 6,4 g (23%) del compuesto **11-3**.

**[0394] Compuesto 11-5:** Compuesto **11-3** (1,0 g, 3,12 mmol), N-hidroxiptalimida **11-4** (611 mg, 3,744 mmol) y trifetilfosfina (1,23 g, 4,68 mmol) se disolvieron en 20 mL de tetrahidrofurano seguido por adición de DIAD (0,84 mL, 4,06 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando cartuchos SiliaSep (80 g), eluyendo con 0-100% de acetato de etilo/hexanos, para dar 1,0 g (100%) del compuesto **11-5**.

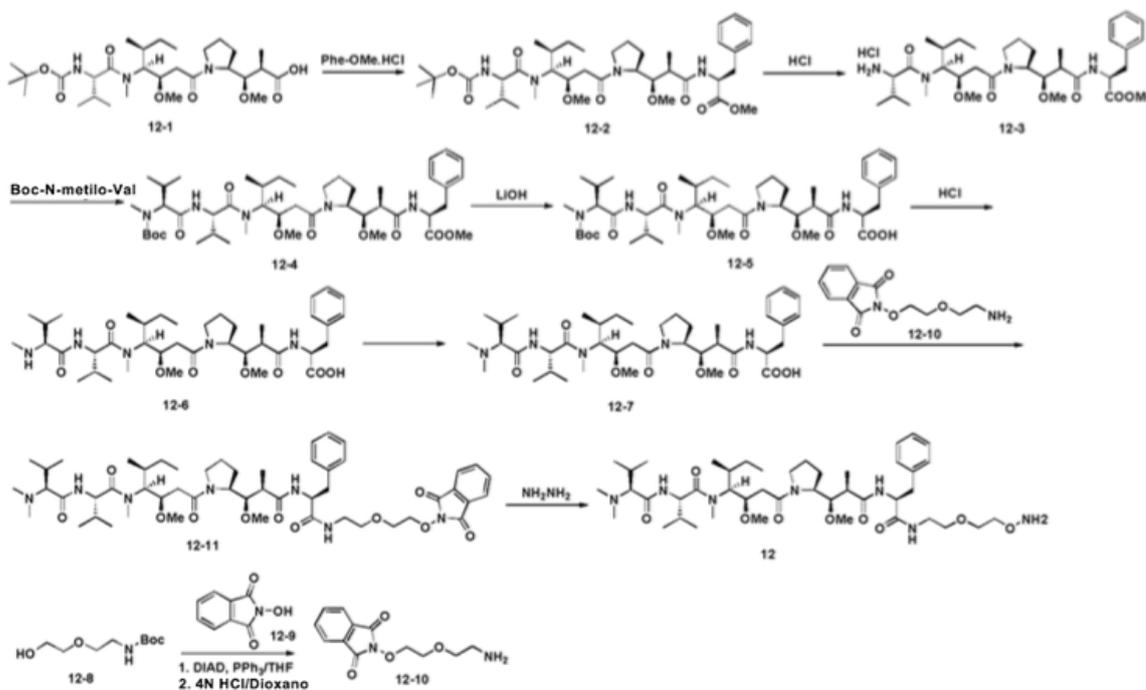
**[0395] Compuesto 11-6:** El Compuesto **11-5** se disolvió en 15 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró a vacío para dar 1,0 g del compuesto **11-6**.

**[0396] Compuesto 11-8:** A una solución de 30 mg (0,0372 mmol) de clorhidrato de monometildolastatina, se añadieron 31 mg (0,0744 mmol) de compuesto **11-6** y 38,2 mg (0,082 mmol) de PyBroP en 1 mL de DMF se añadió 33  $\mu$ L (0,186 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 28 mg (65%) del compuesto **11-8**. MS (ESI) m/z 785 [M+2H], 1164 [M+H].

**[0397] Compuesto 11:** Compuesto **11-8** (28 mg, 0,024 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadieron 23 mL (0,72 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidrócloruro de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 20 mg (66%) de Compuesto 11. MS (ESI) m/z 518 [M+2H], 1034 [M+H].

### Ejemplo 12: Síntesis del Compuesto 12

**[0398]**



**[0399] Compuesto 12-2:** A una solución del compuesto **12-1** (500 mg, 0,875 mmol) en 3 mL de DMF se añadieron 283 mg de hidrócloruro de fenilalanina, 433 mg de HATU y 581 ml de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 mLX1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida para dar 560 mg (76%) del compuesto **12-2**.

**[0400] Compuesto 12-3:** El Compuesto **12-2** se disolvió en 15 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró a vacío para dar 511 mg del compuesto **12-3**.

5 **[0401] Compuesto 12-4:** A una solución del compuesto **12-3** (368 mg, 0.55 mmol) en 3 mL de DMF se añadieron 255 mg de Boc-N-metilo valina, 314 mg de HATU y 303 µL de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida para dar 370 mg (79%) del compuesto **12-4**.

10 **[0402] Compuesto 12-5:** A una solución del compuesto **12-4** (170 mg) en 10 mL de MeOH se añadieron 5eq de IN LiOH. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con IN HCl y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío para dar 150 mg (90%) del compuesto **12-5**.

15 **[0403] Compuesto 12-6:** El Compuesto **12-5** se disolvió en 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró a vacío y se purificó por HPLC para dar 150 mg del compuesto **12-6**.

20 **[0404] Compuesto 12-7:** A una solución del compuesto **12-6** en DMF se añadió formilaldehído (3eq) y 20 equivalentes de ácido acético, seguido de la adición de 2 eq de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar el compuesto **12-7**.

25 **[0405] Compuesto 12-10:** 2-(2-hidroxietoxi)etilcarbamato de terc-butilo (2,05 g, 10 mmol), N-hidroxiftalimida (1,8 g, 11 mmol) y trifenilfosfina (3,67 g, 14 mmol) se disolvieron en 100 mL de tetrahidrofurano seguido de la adición de DIAD (2,48 mL, 12 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se concentró a sequedad. El residuo se trató con 50 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó a vacío para obtener 2,6 g (91%) del compuesto **12-10**. MS (ESI) m/z 251 [M+H].

30 **[0406] Compuesto 12-11:** A una solución del compuesto **12-10** (20 mg, 0,026 mmol) en 1 mL de DMF se añadieron 11,2 mg del compuesto **12-10**, 15 mg de HATU y 23 mL de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 20 mg (70%) del compuesto **12-4**. MS (ESI) m/z 490 [M+2H], 978 [M+H].

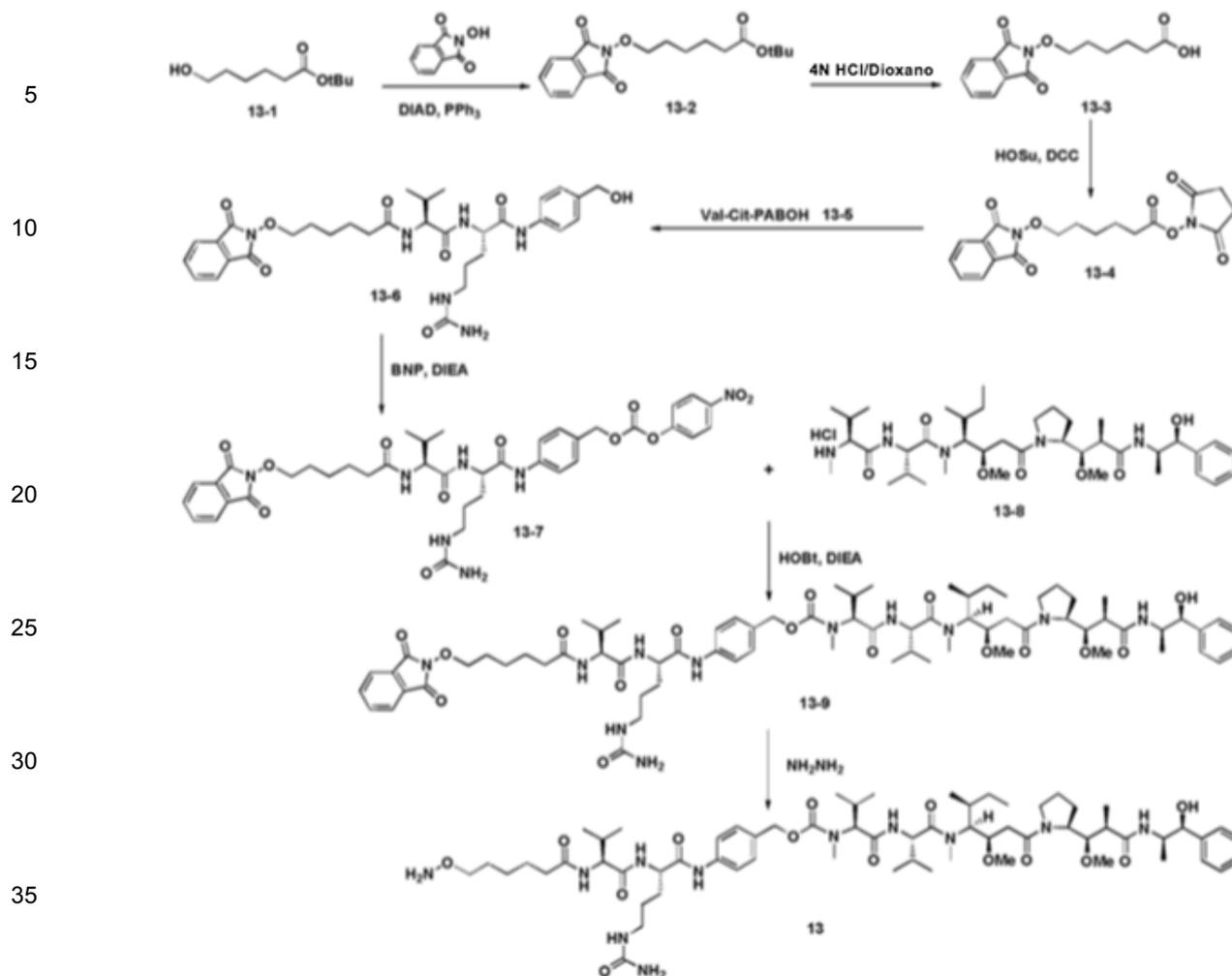
35 **[0407] Compuesto 12:** El compuesto **12-11** (20 mg, 0,0183 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadieron 18 µL (0,56 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidrocloreuro de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 14 mg (72%) de Compuesto 12. MS (ESI) m/z 425 [M+2H], 848 [M+H].

40

### **Ejemplo 13: Síntesis del Compuesto 13**

45 **[0408]**

45



40 **[0409] Compuesto 13-2:** 6-hidroxihexanoato de terc-butilo **13-1** (1,5 g, 1,97 mmol), N-hidroxiiftalimida (1,42 g, 8,76 mmol) y trifetilfosfina (2,82 g, 10,76 mmol) se disolvieron en 50 mL de tetrahidrofurano seguido de la adición de DIAD (2 mL, 9,564 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida para dar 2,5 g (95%) del compuesto **13-2**.

45 **[0410] Compuesto 13-3:** El Compuesto **13-2** se trató con 15 mL de 4N HCl en dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas y se concentró a sequedad a vacío para dar 900 mg (100%) del compuesto **13-3**.

50 **[0411] Compuesto 13-4:** A una solución del compuesto **13-3** (900 mg, 3,0 mmol) en 10 mL de THF se añadieron 397 mg de N-hidroxisuccinimida, seguido de la adición de 669 mg de DCC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se filtró. La filtración se concentró y se trató con 10 mL de DCM. La solución de DCM se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora y se filtró. La filtración se concentró y se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 800 mg (71%) del compuesto **13-4**.

55 **[0412] Compuesto 13-6:** La mezcla del compuesto **13-4** (435 mg, 1,16 mmol) y Val-Cit-PABOH **13-5** (400 mg, 1,054 mmol) en 12 mL de DMF se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró y se lavó con éter. El sólido se secó a vacío para dar 660 mg (98%) del compuesto **13-6**.

60 **[0413] Compuesto 13-7:** A la solución del compuesto **13-6** (200 mg, 0,313 mmol) en 6 mL de DMF se añadió bis (p-nitrofenilo) carbonato (286 mg, 0,94 mmol), seguido de la adición de 110,2 mL de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas y se concentró. El residuo se trató con éter y se filtró. El sólido recogido se lavó con éter, ácido cítrico al 5%, agua, éter y se secó a vacío para dar 210 mg (83%) del compuesto **13-7**.

65

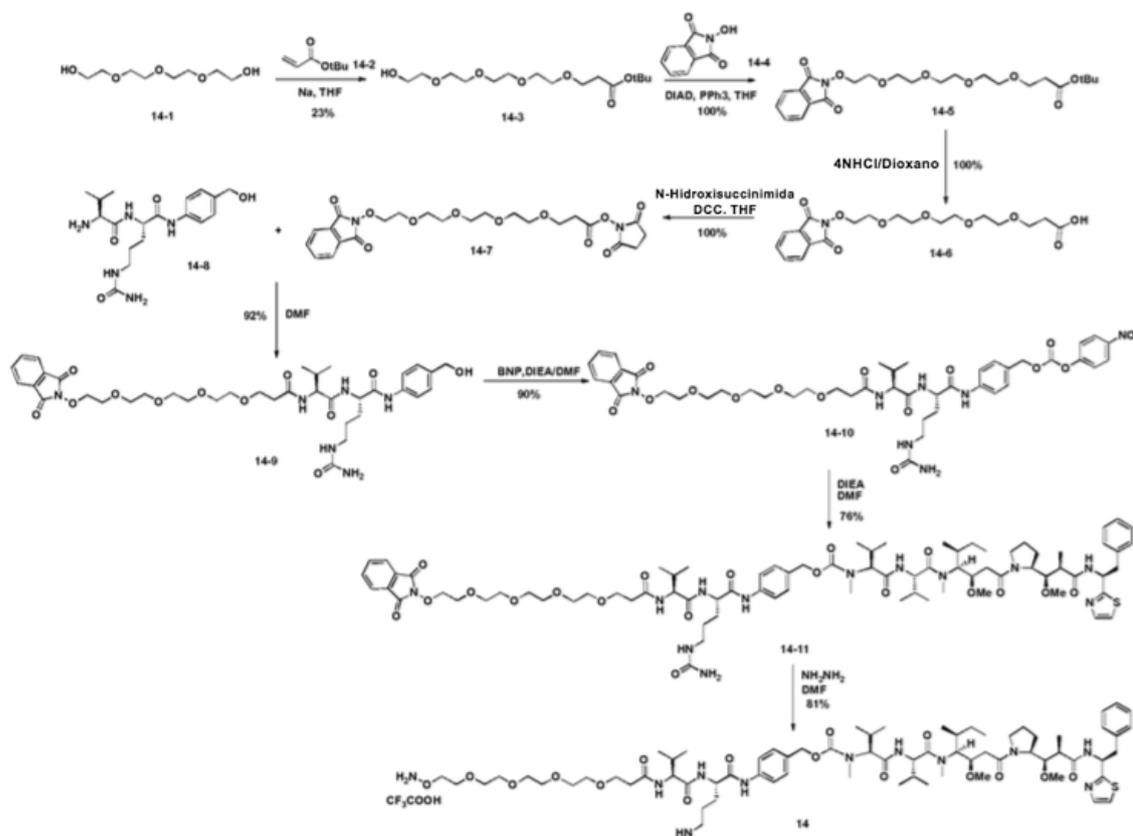
**[0414] Compuesto 13-9:** A una solución de sal de clorhidrato de monometilauristatina **13-8** (100 mg, 0,1325 mmol) en 2 mL de DMF se añadió el compuesto **13-7** (159 mg, 0,2 mmol) y 10 mg de HOBt, seguido de la adición de 35,2  $\mu\text{L}$  de DIEA. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar 93 mg (51%) del compuesto **13-9**. MS (ESI)  $m/z$  692 [M+2H], 1382 [M+H].

**[0415] Compuesto 13:** El Compuesto **13-9** (50 mg, 0,036 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadieron 23 mL de hidrazina. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se inactivó con una solución de hidrocioruro de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 32 mg (65%) de Compuesto **13**. MS (ESI)  $m/z$  638,5 [M+Na+2H], 1253,3 [M+H], 1275,8 [M+Na].

#### Ejemplo 14: Síntesis del Compuesto 14

**[0416]**

Esquema 14



**[0417] Compuesto 14-3:** A una solución de tetra (etilenglicol) **14-1** (40,6 mL, 235 mmol) en 100 mL de tetrahydrofurano se añadieron 47 mg de sodio. Se añadieron 12 mL de acrilato de terc-butilo después de disolver el sodio. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se inactivó con 2 mL de 1 N HCl. El residuo se suspendió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo (100 ml X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío para dar 6,4 g (23%) del compuesto **14-3**.

**[0418] Compuesto 14-5:** El compuesto **14-3** (1,0 g, 3,12 mmol), N-hidroxifalimida **14-4** (611 mg, 3,744 mmol) y trifetilfosfina (1,23 g, 4,68 mmol) se disolvieron en 20 mL de tetrahydrofurano seguido por adición de DIAD (0,84 mL, 4,06 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando cartuchos SiliaSep (80 g), eluyendo con 0-100% de acetato de etilo/hexanos, para dar 1,0 g (100%) del compuesto **14-5**.

**[0419] Compuesto 14-6:** El compuesto **14-5** se disolvió en 15 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró a vacío para dar 1,0 g del compuesto **14-6**.

**[0420] Compuesto 14-7:** A una solución del compuesto **6** (1,93 g, 4,68 mmol) y N-hidroxisuccinimida (646 mg, 5,616 mmol) en 20 mL de tetrahydrofurano se agregaron 1,062 g (5,148 mmol) de DCC. La mezcla de reacción se agitó a

temperatura ambiente durante la noche y se filtró. La filtración se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando cartuchos SiliaSep (80 g), eluyendo con 0-100% de acetato de etilo/hexanos para dar 2,37 g (100%) del compuesto **14-7**.

5 **[0421] Compuesto 14-8:** El Compuesto **14-8** se preparó de acuerdo con la bibliografía (Bioconjugat Chem. 2002, 13 (4), 855-869).

10 **[0422] Compuesto 14-9:** A una solución del compuesto **14-8** (200 mg, 0,527 mmol) en 2 mL de DMF se añadieron 295 mg (0,58 mmol) del compuesto **14-7**. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se concentró al vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó a vacío para dar 402 mg (98%) del compuesto **14-9**.

15 **[0423] Compuesto 14-10:** A una solución del compuesto **14-9** (406 mg, 0,527 mmol) y carbonato de bis(p-nitrofenol) (481 mg, 1,58 mmol) en 10 mL de DMF se añadieron 0,186 mL (1,054 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter, ácido cítrico al 5%, agua, éter y se secó a vacío para dar 350 mg (72%) del compuesto **14-10**.

20 **[0424] Compuesto 14-11:** A una solución de 50 mg (0,062 mmol) de hidroclicloruro de monometildolastatina, 87,2 mg (0,093 mmol) del compuesto **14-10** y 4,7 mg (0,031 mmol) de HOBt en 1 mL de DMF se añadió 22  $\mu$ L (0,124 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 41 mg (42%) del compuesto **14-11**. MS (ESI) m/z 785 [M+2H].

25 **[0425] Compuesto 14:** Compuesto **14-11** (41 mg, 0,026 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadieron 17  $\mu$ L (0,52 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidroclicloruro de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 22 mg (58%) de compuesto **14**. EM (ESI) m/z 720 [M+2H].

### 30 **Ejemplo 15: Síntesis del Compuesto 15**

**[0426]**

Esquema 15

35

40

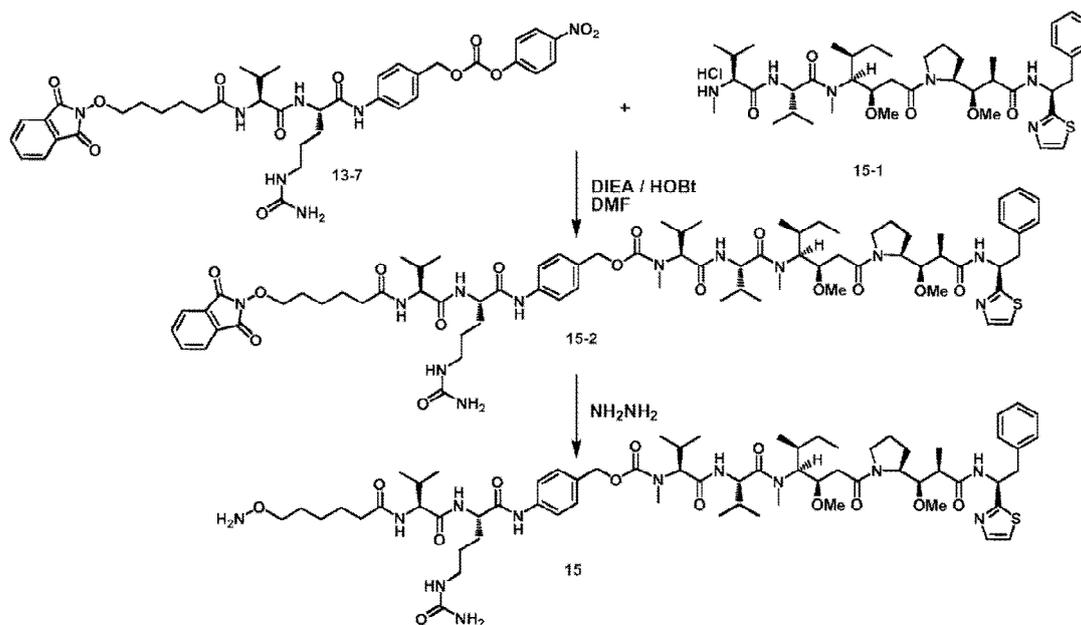
45

50

55

60

65



**[0427] Compuesto 15-2:** A una solución de 50 mg (0,062 mmol) de hidroclicloruro de monometildolastatina, 75 mg (0,093 mmol) de compuesto **13-7** y 4,7 mg (0,031 mmol) de HOBt en 1 mL de DMF se añadieron 22  $\mu$ L (0,124 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 41 mg (42%) del compuesto **15-2**. MS (ESI) m/z 718 [M+2H], 1435 [M+H].

**[0428] Compuesto 15-2:** Compuesto **15-2** (41 mg, 0,026 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadió 17  $\mu$ L (0,52

mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidrócloruro de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 22 mg (58%) del ejemplo 15. MS (ESI) m/z 653 [M+2H], 1305 [M+H].

5

**Ejemplo 16: Síntesis del Compuesto 16**

[0429]

10

Esquema 16

15

20

25

30

35

40

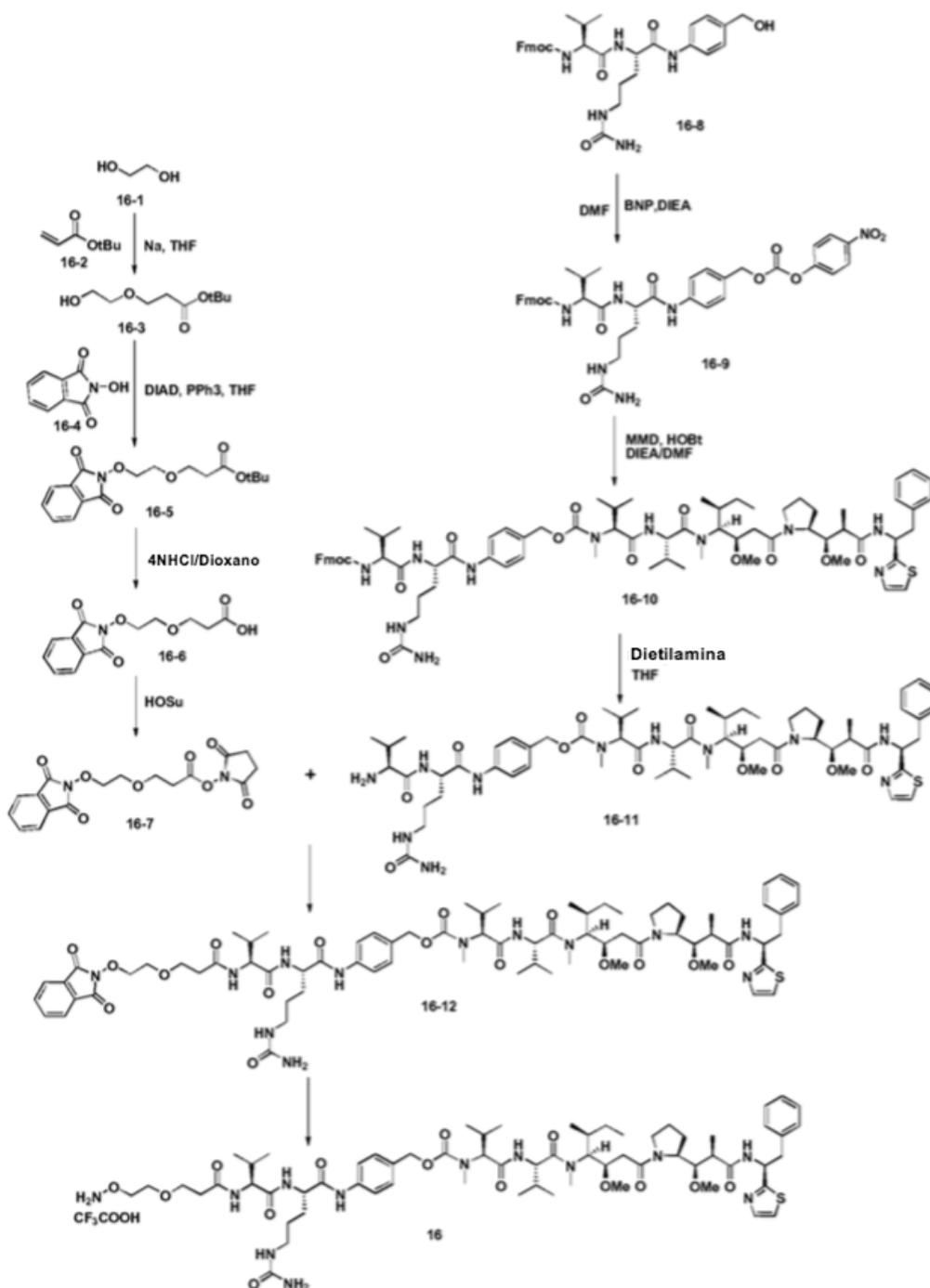
45

50

55

60

65



[0430] Compuesto 16-3: A una solución de etilenglicol 16-1 (13.1 mL, 235 mmol) en 100 mL de tetrahydrofurano se

añadieron 47 mg de sodio. Se añadieron 12 mL de acrilato de terc-butilo después de disolver el sodio. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se inactivó con 2 mL de 1 N HCl. El residuo se suspendió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo (100 ml X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida para dar 5,2 g (24%) del compuesto **16-3**.

**[0431] Compuesto 16-5:** Compuesto **16-3** (2,0 g, 10,5 mmol), N-hidroxifalimida (2,05 g, 12,6 mmol) y trifetilfosfina (3,58 g, 13,65 mmol) se disolvieron en 50 mL de tetrahidrofurano seguido por adición de DIAD (3,26 mL, 15,75 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar el compuesto **16-5**.

**[0432] Compuesto 16-6:** El Compuesto **16-5** se disolvió en 15 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró a vacío para dar el compuesto **16-6**.

**[0433] Compuesto 16-7:** A una solución del compuesto **16-6** (5,16 mmol) y N-hidroxisuccinimida (722 mg, 6,7 mmol) en 20 mL de tetrahidrofurano se añadieron 1,28 g (6,2 mmol) de DCC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se filtró. La filtración se concentró y se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 500 mg del compuesto **16-7**.

**[0434] Compuesto 16-8:** El Compuesto **16-8** se preparó de acuerdo con la bibliografía (Bioconjugat Chem. 2002, 13 (4), 855-869).

**[0435] Compuesto 16-9:** A una solución del compuesto **16-8** (5,0 g, 8,3 mmol) y bis(p-nitrofenol) carbonato (7,6 g, 25 mmol) en 100 mL de DMF se añadieron 2,92 mL (16,6 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter, ácido cítrico al 5%, agua, éter y se secó a vacío para dar 5,0 g (81%) del compuesto **16-9**.

**[0436] Compuesto 16-10:** A una solución de 1,0 g (1,24 mmol) de clorhidrato de monometildolastatina, se añadieron 1,42 g (1,8575 mmol) de compuesto **16-9** y 95 mg (0,62 mmol) de HOBt en 10 mL de DMF 437 mL (2,48 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 1,0 g (58%) del compuesto **16-10**. MS (ESI) m/z 700 [M+2H], 1398 [M+H].

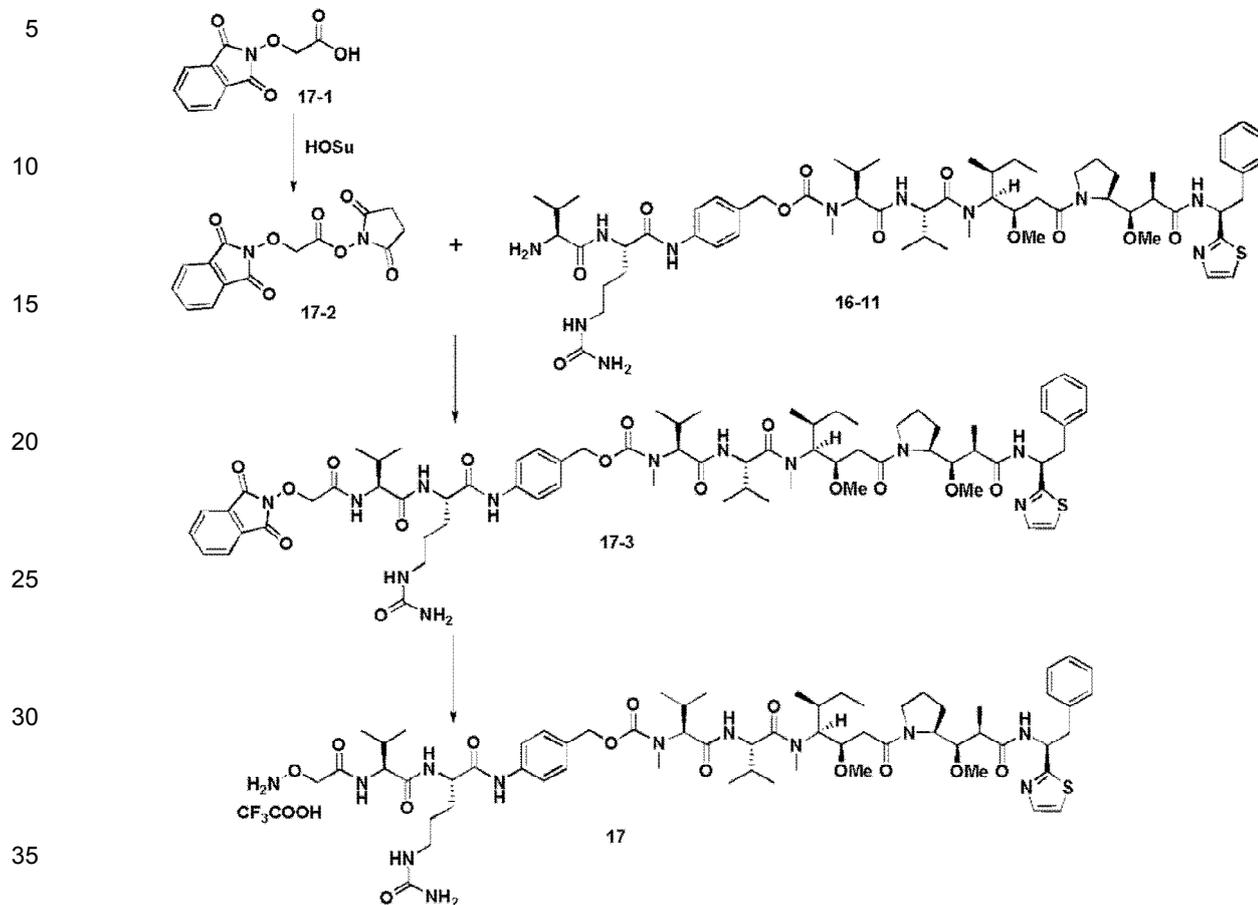
**[0437] Compuesto 16-11:** A una solución del compuesto **16-10** (1,0 g, 0,715 mmol) en 15 mL de tetrahidrofurano se añadieron 5 mL (48 mmol) de dietilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 20 mL de DCM, se trató con 200 mL de éter y se filtró, se evaporó con éter y se secó a vacío para dar 860 mg del compuesto **16-11**. MS (ESI) m/z 589 [M+2H], 1176 [M+H].

**[0438] Compuesto 16:** A una solución de 50 mg (0,0425 mmol) del compuesto **16-11** en 1 mL de DMF se añadieron 32 mg (0,085 mmol) del compuesto **16-7**. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La HPLC y la MS mostraron la reacción realizada. Se añadieron 27,2 µL (0,85 mmol) de hidrazina anhidra a la mezcla de reacción. La reacción se realizó en 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con IN HCl y se purificó por HPLC para dar 40 mg (66%) del compuesto 16. MS (ESI) m/z 654 [M+2H], 1307 [M+H].

#### **Ejemplo 17: Síntesis del Compuesto 17**

**[0439]**

## Esquema 17



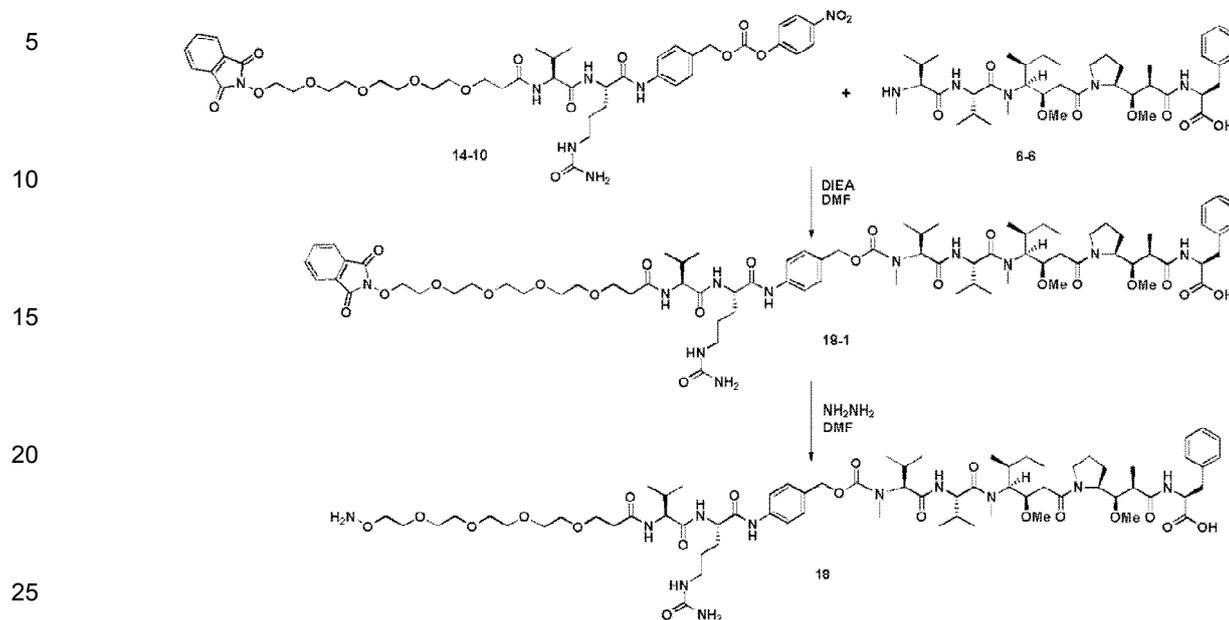
[0440] **Compuesto 17-2:** A una solución del compuesto **17-1** (1,0 g, 4,52 mmol) y N-hidroxisuccinimida (572 mg, 4,97 mmol) en 20 mL de tetrahydrofurano se añadieron 1,12 g (5,424 mmol) de DCC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se filtró. La filtración se concentró para dar el compuesto **17-2**.

[0441] **Compuesto 17:** A una solución de 50 mg (0,0425 mmol) del compuesto **16-11** en 1 mL de DMF se añadieron 41 mg (0,1275 mmol) del compuesto 17-2. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La HPLC y la MS mostraron la reacción realizada. Se añadieron 20 mL (0,625 mmol) de hidrazina anhidra a la mezcla de reacción. La reacción se realizó en 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con IN HCl y se purificó por HPLC para dar 35 mg (60%) del compuesto **17**. MS (ESI) m/z 625 [M+2H], 1249 [M+H].

**Ejemplo 18: Síntesis del Compuesto 18**

50 [0442]

Esquema 18



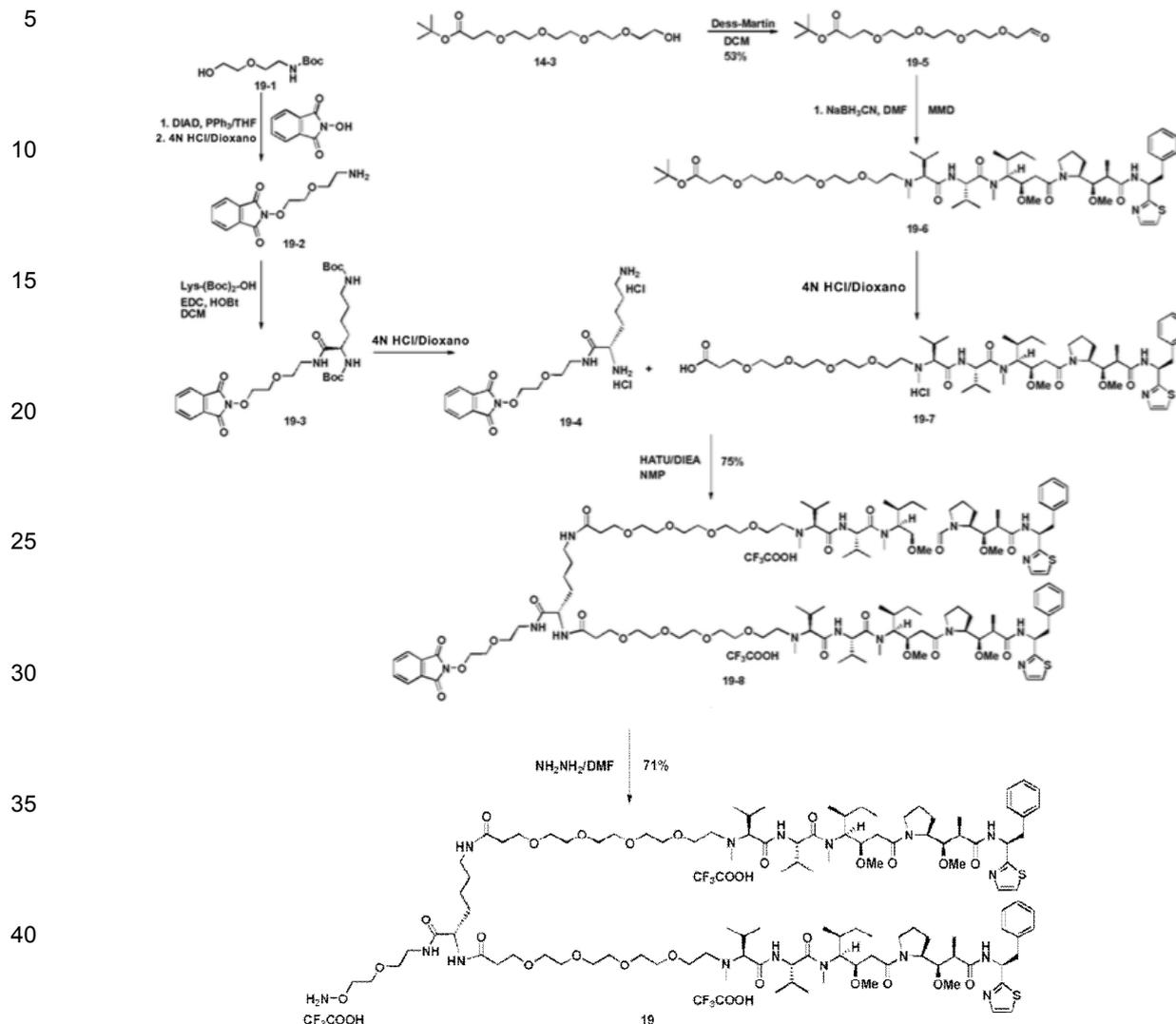
30 **[0443] Compuesto 18-1:** A una solución del compuesto **6-6**, se le añadió diisopropiletilamina a mg (0,062 mmol) del compuesto **14-10** y HOBt en 1 mL de DMF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar el compuesto **18-1**.

35 **[0444] Compuesto 18:** El Compuesto **18-1** se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadió hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidrócloruro de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar el compuesto **18**.

#### **Ejemplo 19: Síntesis del Compuesto 19**

40 **[0445]**

Esquema 19



**[0446] Compuesto 19-2:** 2-(2-hidroxietoxi)etilcarbamato de terc-butilo 13 (2,05 g, 10 mmol), N-hidroxiftalimida (1,8 g, 11 mmol) y trifetilfosfina (3,67 g, 14 mmol) se disolvieron en 100 mL de tetrahydrofurano seguido de la adición de DIAD (2,48 mL, 12 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se concentró a sequedad. El residuo se trató con 50 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó a vacío para obtener 2,6 g (91%) del compuesto **19-2**. MS (ESI) m/z 251 [M+H].

**[0447] Compuesto 19-3:** A la mezcla del compuesto **19-2** (315 mg, 1,1 mmol), Boc-Lys(Boc)-OH (365 mg, 1 mmol), EDC (382 mg, 2 mmol) y HOBt (306 mg, 2 mmol) en 10 mL de DCM se añadieron 1,056 ml (6 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con ácido cítrico al 5%, se saturó con bicarbonato de sodio, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida usando cartuchos SiliaSep (40 g), eluyendo con 0-100% de acetato de etilo/hexanos, para dar 405 mg (70%) del compuesto **19-3**.

**[0448] Compuesto 19-4:** El compuesto **19-3** se disolvió en 15 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró a vacío para dar 315 mg (98%) del compuesto **19-4**. MS (ESI) m/z 379 [M+H].

**[0449] Compuesto 19-5:** A una solución del compuesto **14-3** (322 mg, 1 mmol) en 20 mL de diclorometano se

añadió Peryodinano de Dess-Martin (636 mg, 1,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se inactivó con una solución de tiosulfato sódico (1,4 g, 8,85 mmol) en 15 mL de bicarbonato sódico saturado. La mezcla fue separada. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida usando cartuchos SiliaSep (40 g), eluyendo con 0-100% de acetato de etilo/hexanos para dar 170 mg (53%) del compuesto **19-5**.

**[0450] Compuesto 19-6:** A una solución de hidrocloreuro de monometildolastatina 1,0 g (1,24 mmol) en 20 mL de DMF se añadieron 1,19 g (3,72 mmol) del compuesto 17 seguido de 1,4 mL (24,8 mmol) de ácido acético y 156 mg (2,48 mmol) de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se ajustó a pH 8 con bicarbonato de sodio y se extrajo con DCM, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida usando cartuchos SiliaSep (40 g), eluyendo con metanol al 0-5%/DCM para dar 680 mg (51%) del compuesto **19-6**. MS (ESI) m/z 538 [M+2H], 1075 [M+H].

**[0451] Compuesto 19-7:** A una solución del compuesto **19-6** (680 mg, 0,632 mmol) en 5 mL de DCM se añadieron 20 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó a vacío para dar 660 mg (98%) del compuesto **19-7**. MS (ESI) m/z 510 [M+2H], 1019 [M+H].

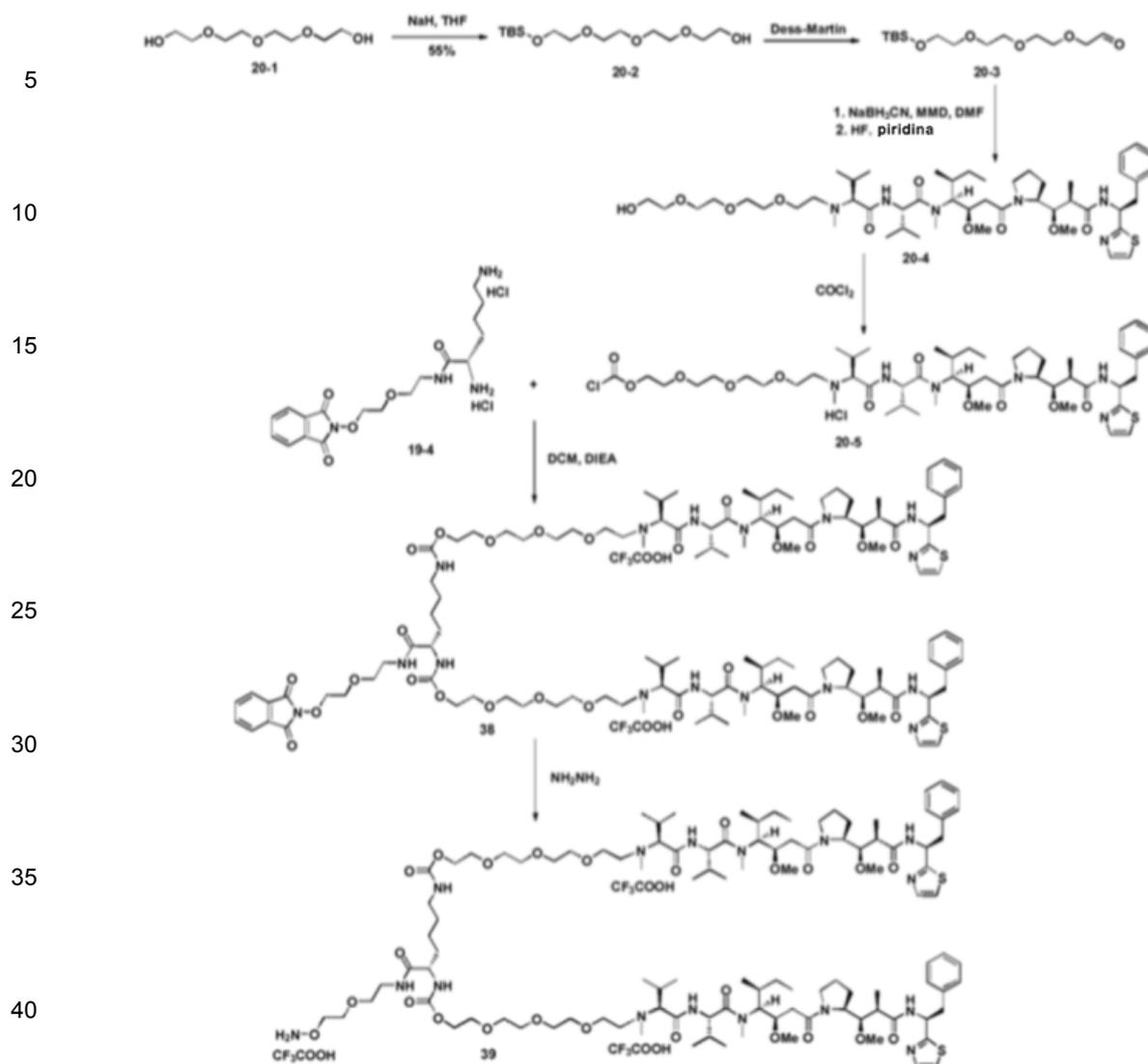
**[0452] Compuesto 19-8:** A una solución del compuesto **19-7** (280 mg, 0,257 mmol), compuesto **19-4** (38 mg, 0,0857 mmol) y N-metilmorfolina (0,283 mL, 2,57 mmol) en 5 mL de N-metilpirrolidinona se añadió 98 mg (0,257 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 160 mg (71%) del compuesto **19-8**. MS (ESI) m/z 596 [M+4H], 794 [M+3H], 1191 [M+2H].

**[0453] Compuesto 19:** Compuesto **19-8** (160 mg, 0,0613 mmol) se disolvió en 1,5 mL de DMF. Se añadieron 20 mL (0,613 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidrocloreuro de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 120 mg (75%) del compuesto **19**. MS (ESI) m/z 451 [M+5H], 563 [M+4H], 751 [M+3H], 1126 [M+2H].

#### ***Ejemplo 20: Síntesis del compuesto 20***

**[0454]**

Esquema 20



45 **[0455] Compuesto 20-2:** A una solución de tetra (etilenglicol) **20-1** (8,0 g, 41,2 mmol) en 100 mL de tetrahydrofurano se añadieron 1,65 g de hidruro de sodio a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 6,21 g de TBS-Cl a esta solución. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se inactivó con 2 mL de 1 N HCl. El residuo se suspendió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo (100 ml X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida para dar 5,7 g del compuesto **20-2**.

55 **[0456] Compuesto 20-3:** A una solución del compuesto **20-2** (500 mg, 1,62 mmol) en 30 mL de diclorometano se añadió peryodinano de Dess-Martin (1,03 g, 2,43 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se inactivó con una solución de tiosulfato sódico (1,4 g, 8,85 mmol) en 15 mL de bicarbonato sódico saturado. La mezcla fue separada. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 400 mg del compuesto **20-3**.

60 **[0457] Compuesto 20-4:** A una solución de hidrocloreto de monometildolastatina 213 mg (0,263 mmol) en 4 mL de DMF se añadieron 245 mg (0,75 mmol) del compuesto **20-3** seguido de 0,303 mL (5 mmol) de ácido acético y 34 mg (0,5 mmol) de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a vacío. Se añadieron 3 mL de acetonitrilo al 60%, seguido de 0,2 mL de piridina HF a 0°C. La solución resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente orgánico se eliminó a vacío. El residuo se ajustó a pH 8 con bicarbonato de sodio y se extrajo con DCM, se lavó con salmuera, se secó sobre

65

sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida para dar 160 mg del compuesto **20-4**. MS (ESI) m/z 474 [M+2H], 947 [M+H].

5 **[0458] Compuesto 20-5:** A una solución del compuesto **20-4** (50 mg, 0,062 mmol) en 4 mL de DCM se añadieron 0,3 mL de fosgeno/tolueno a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 3 horas y se concentró a vacío para la siguiente etapa sin purificación.

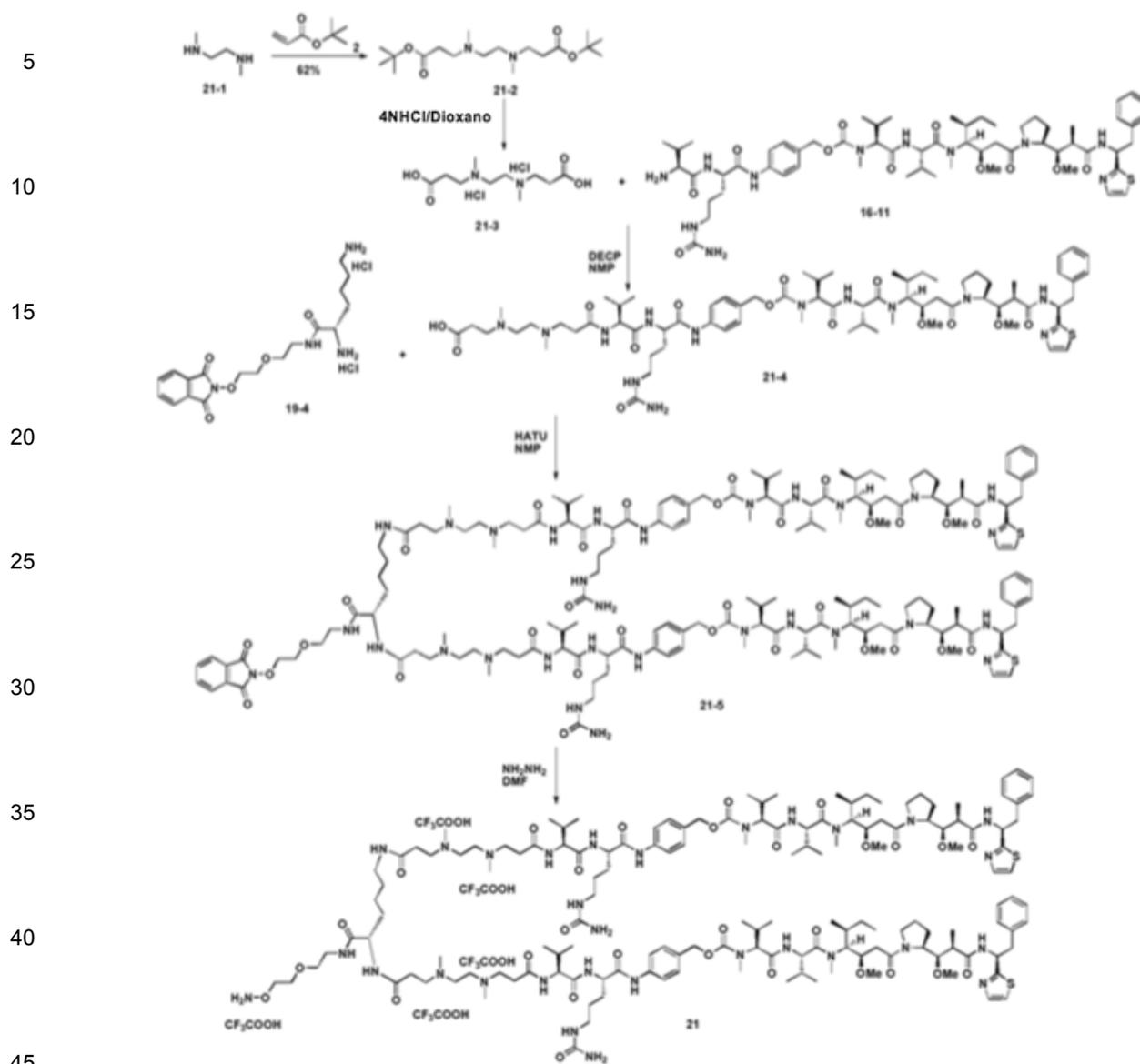
10 **[0459] Compuesto 20-6:** A una solución del compuesto **19-4** (7,6 mg, 0,017 mmol) y el compuesto **20-5** (0,062 mmol) se añadieron 25 µL de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 33 mg del compuesto 20-6. MS (ESI) m/z 582 [M+4H], 775 [M+3H], 1163 [M+2H].

15 **[0460] Compuesto 20:** Compuesto **20-6** (33 mg, 0,014 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadió 14 µL (0,43 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidrócloruro de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 10 mg de compuesto 20. MS (ESI) m/z 549 [M+4H], 732 [M+3H], 1098 [M+2H].

20 **Ejemplo 21: Síntesis del Compuesto 21**

**[0461]**

Esquema 21



50 **[0462] Compuesto 21-2:** La mezcla de N, N'-dimetiletilendiamina **21-1** (5 mL, 46,5 mmol) y acrilato de terc-butilo 13 mL (116 mmol) se calentó a 85°C durante 1 hora. Se añadieron otros 13 mL (116 mmol) de acrilato de terc-butilo. La mezcla de reacción se calentó continuamente a 85°C durante 1 hora y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se diluyó con hexanos y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando cartuchos SiliaSep (120 g), eluyendo con metanol al 0-5%/DCM para dar 10,1 g (62%) del compuesto **21-2**. MS (ESI) m/z 345 [M+H].

55 **[0463] Compuesto 21-3:** A una solución del compuesto **21-2** (5,0 g, 14,5 mmol) en 50 mL de DCM se añadieron 40 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días y se concentró al vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó a vacío para dar 4,3 g (97%) del compuesto **21-3**.

60 **[0464] Compuesto 21-4:** A una solución de 166 mg (0,544 mmol) del compuesto **21-3** y 0,15 ml de N-metilmorfolina en 10 mL de N-metilpirrolidona se añadieron 160 mg del compuesto **16-11**, seguido de 0,068 mL (0,408 mmol) de DECP. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 35-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 100 mg (50%) del compuesto **21-4**. MS (ESI) m/z 464 [M+3H], 696 [M+2H], 1391 [M+H].

65

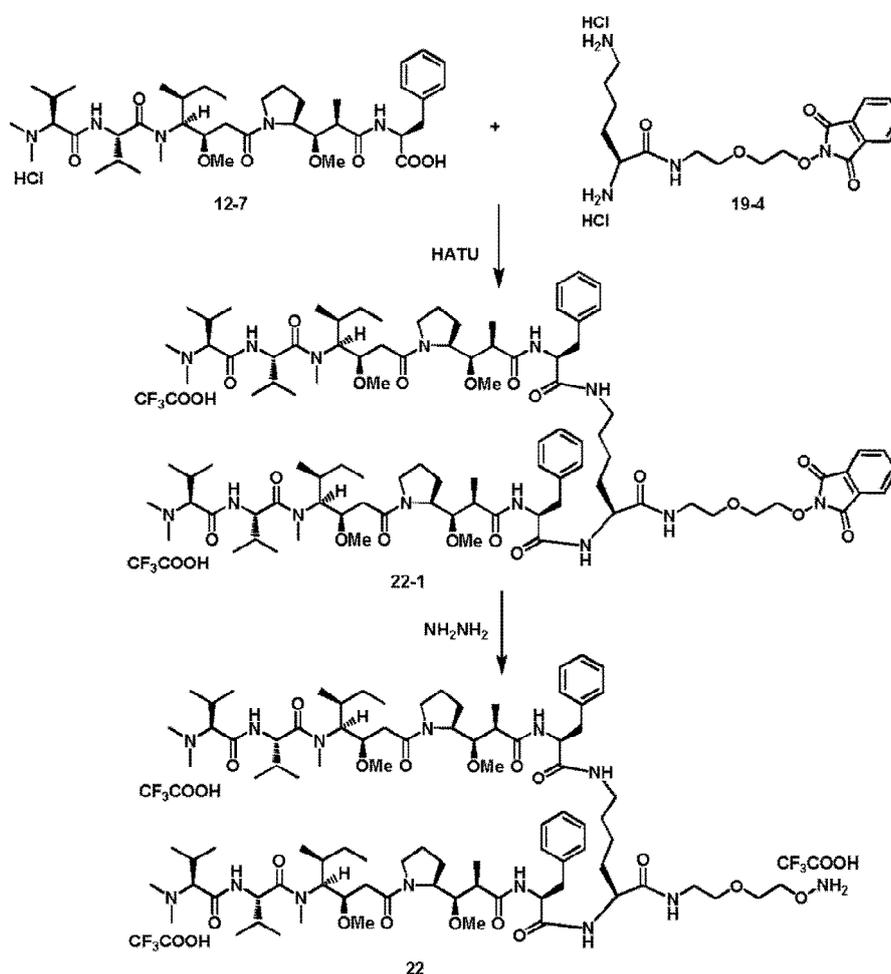
**[0465] Compuesto 21-5:** A una solución del compuesto **19-4** (11 mg, 0,025 mmol), compuesto **21-4** (115 mg, 0,077 mmol) y N-metilmorfolina (0,028 mL, 0,25 mmol) en 1,5 mL de N-metilpirrolidiona se añadió 29,3 mg (0,077 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 60 mg (67%) del compuesto **21-5**. MS (ESI) m/z 625 [M+5H], 781 [M+4H], 1041 [M+3H].

**[0466] Compuesto 21:** El compuesto **21-5** (60 mg, 0,014 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadieron 7 mL (0,21 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidrocloreto de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 29 mg (58%) del compuesto **21**. MS (ESI) m/z 599 [M+5H], 749 [M+4H], 998 [M+3H].

### Ejemplo 22: Síntesis del Compuesto 22

**[0467]**

Esquema 22



**[0468] Compuesto 22-1:** A una solución del compuesto **19-4** (7,6 mg, 0,017 mmol), compuesto **12-7** (40 mg, 0,051 mmol) y DIEA (0,030 mL, 0,17 mmol) en 2 mL de DMF se añadió 32 mg (0,085 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 24 mg (68%) del compuesto **22-1**. MS (ESI) m/z 612 [M+3H], 917 [M+2H], 1834 [M+H].

**[0469] Compuesto 22:** El Compuesto **22-1** (24 mg, 0,012 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadieron 12 mL (0,36 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidrocloreto de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 15 mg (58%) del Ejemplo **21**. MS (ESI) m/z 569 [M+3H], 852 [M+2H], 1726 [M+2H].

**Ejemplo 23: Síntesis del compuesto 23****[0470]**

5

Esquema 23

10

15

20

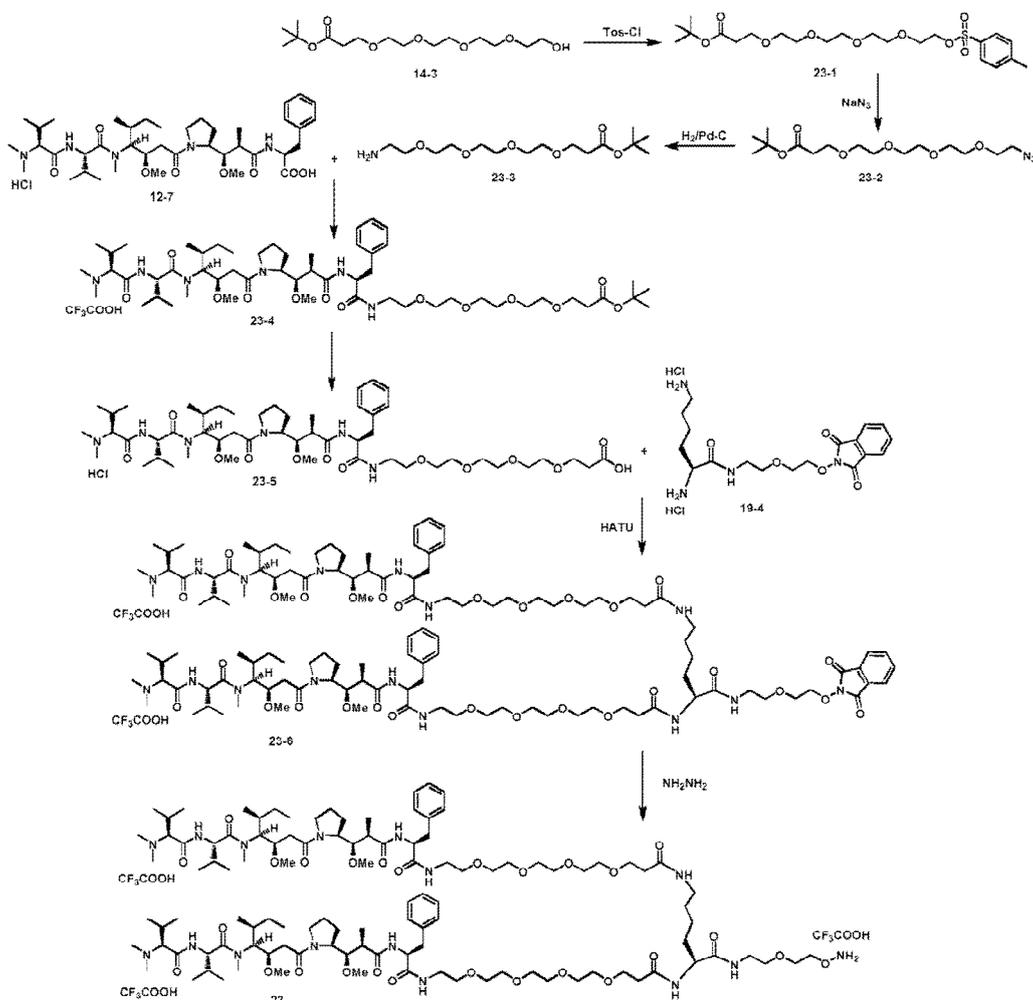
25

30

35

40

45



**[0471] Compuesto 23-1:** A una solución del compuesto **14-3** (4.0 g, 12.4 mmol) y 6,6 mL (37.2 mmol) de DIEA en 50 mL de DCM se agregó 3,31 g de cloruro de toluenosulfonilo a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se combinó y se lavó con ácido cítrico al 5%, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 3,5 g del compuesto **23-1**.

**[0472] Compuesto 23-2:** A una solución del compuesto **23-1** (3,5 g, 7,34 mmol) en 20 mL de DMF se añadió azida de sodio (1,44 g, 22,02 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 2 días. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 2,1 g del compuesto **23-2**.

**[0473] Compuesto 23-3:** A una solución del compuesto **23-2** (2,1 g, 6,05 mmol) en 50 mL de MeOH se añadió 400 mg (10%) de Pd-C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo 1 atm de H<sub>2</sub> durante 24 horas. La mezcla de reacción se filtró y se concentró a vacío para dar 2,1 g del compuesto **23-3**. MS (ESI) m/z 322 [M+H].

**[0474] Compuesto 23-4:** A una solución del compuesto **23-3** (33 mg, 0,102 mmol), compuesto 12-7 (40 mg, 0,051 mmol) y 54 ml de diisopropiletilamina en 1 mL de DMF se añadieron 38 mg de HATU. La mezcla de reacción se

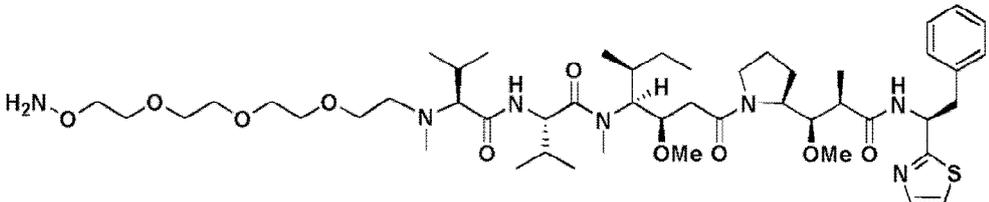
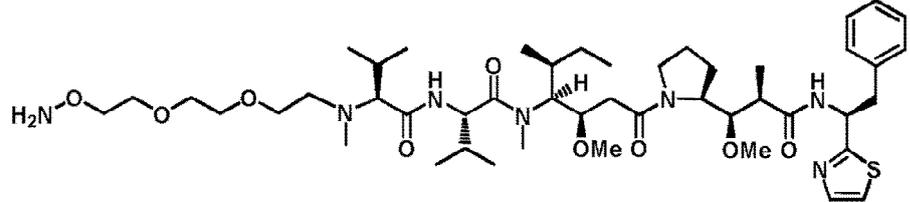
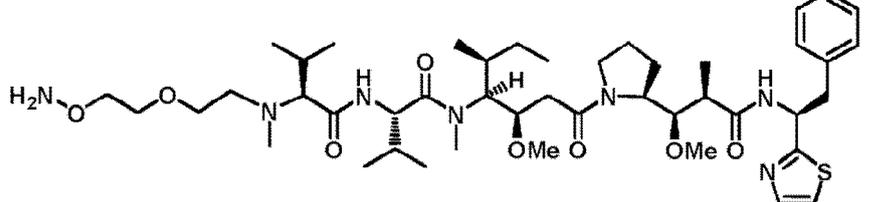
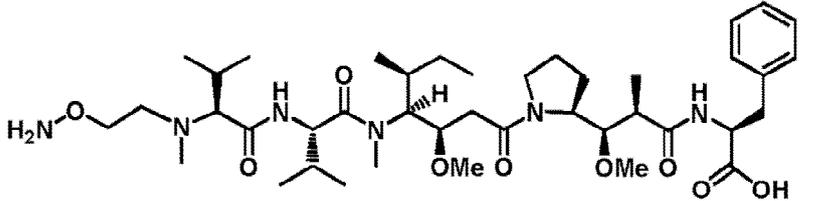
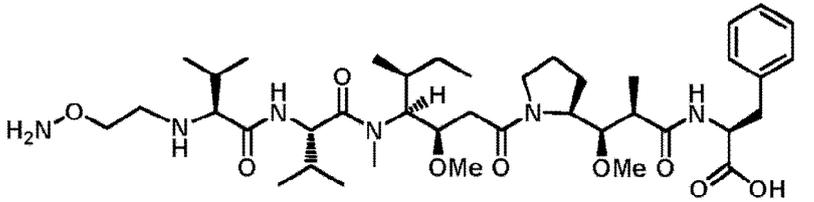
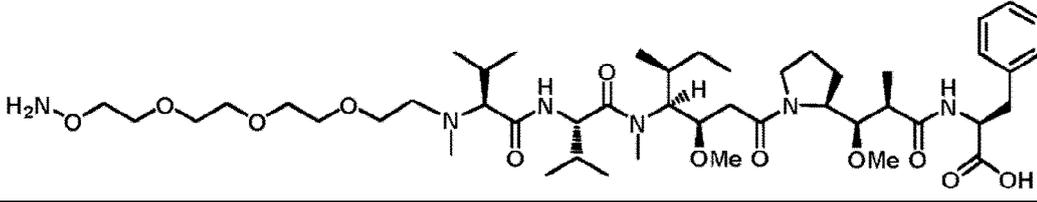
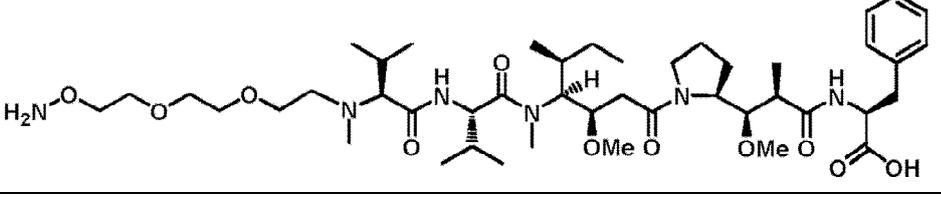
agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 52 mg del compuesto **23-4**. MS (ESI) m/z 525 [M+2H], 1049 [M+H].

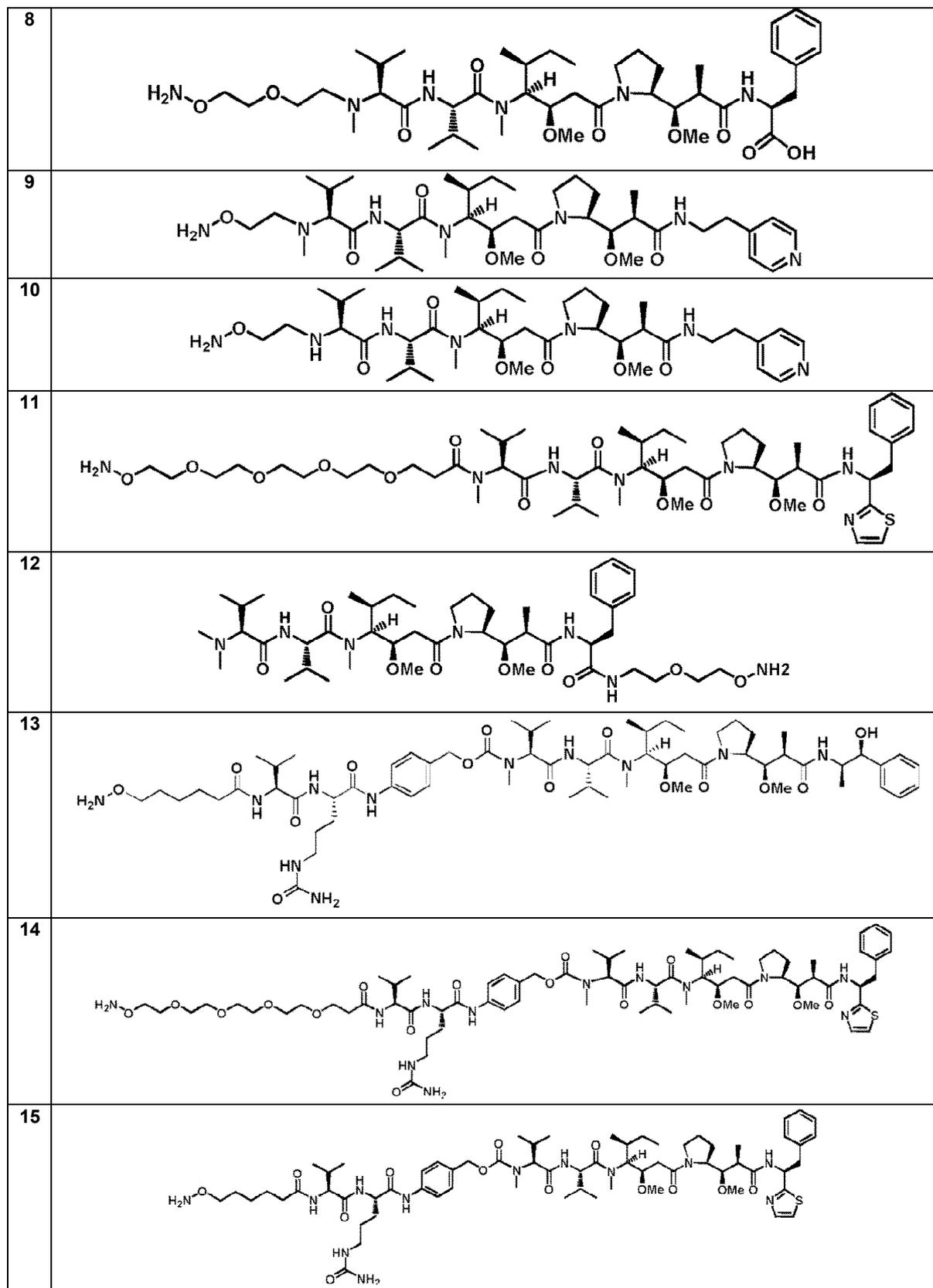
5 **[0475] Compuesto 23-5:** Compuesto **23-4** (52 mg, 0,045 mmol) se disolvió en 5 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró a vacío para dar 52 mg (100%) del compuesto **23-5**. MS (ESI) m/z 497 [M+2H], 993 [M+H].

10 **[0476] Compuesto 23-6:** A una solución del compuesto **19-4** (7,6 mg, 0,017 mmol), compuesto **23-6** (52 mg, 0,051 mmol) y DIEA (0,030 mL, 0,17 mmol) en 2 mL de DMF fue se añadieron 32 mg (0,085 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 26 mg (61%) del compuesto **23-6**. MS (ESI) m/z 583 [M+4H], 777 [M+3H], 1165 [M+2H].

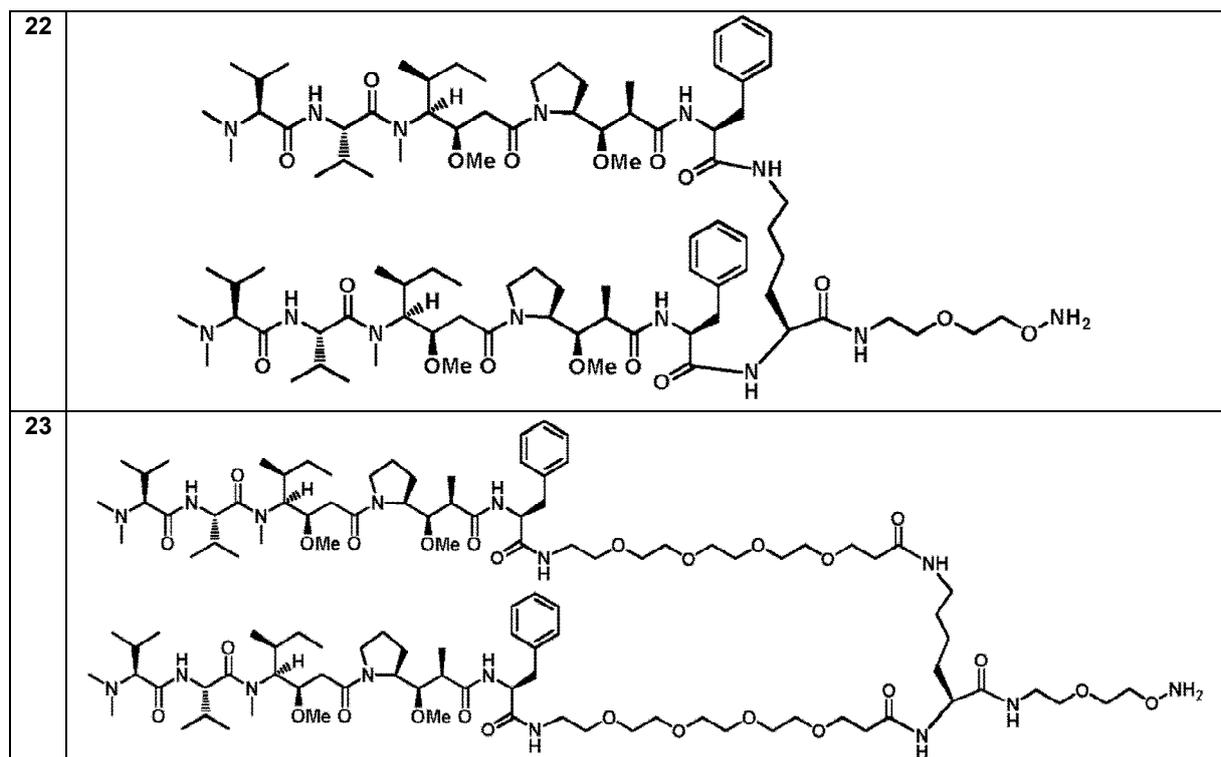
15 **[0477] Compuesto 23:** Compuesto **23-6** (26 mg, 0,01 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadieron 10 mL (0,31 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidrócloruro de IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O en 20 min a 254 nm, para dar 10 mg (40%) del Ejemplo **23**. MS (ESI) m/z 550 [M+4H], 733 [M+3H], 1100 [M+2H].

Tabla 1. Estructuras de compuestos 1-23

Ej.	Estructura
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	







#### Ejemplo de referencia 24: Análisis de la unión de HER-tox al receptor Her2

[0478] Her2-Fc se inmovilizó en un chip CM5 a una densidad de ~ 280 RU. La velocidad de flujo se ajustó a 50 ul/min con HBS-EP como tampón. Las variantes HerTox se inyectaron durante 3 minutos con 15 fases de disociación. Se utilizó un pulso de 30 segundos de 20 mM HCl para la regeneración. El modelo de Bivalent Analyte se utilizó para ajustarse a los datos (Figura 1). El análisis de los datos indica que HerTox HA121-NC2D: Kd ~ 60 pM (chi2 = 4) y HerTox HA121-NC1D: Kd ~ 300 pM (chi2 = 14).

#### Ejemplo de referencia 25: Transfección transitoria

[0479] El cultivo de CHO-S se siembra a  $0,75 \times 10^6$ /mL aproximadamente 16 horas antes de la transfección en medio FreeStyle Cho. Las células están listas para transfectarse al día siguiente cuando el recuento de células haya alcanzado  $1,4 - 1,6 \times 10^6$ /mL. Cuando las células alcanzan el recuento objetivo, se añade una reserva de pAF 400 mM a una concentración de cultivo final de 1,4 mM. El complejo PEI/ADN se prepara como se describe: el ADN ( $1,42 \mu\text{g}/1 \times 10^6$  células) se disuelve en RPMI (5% (v/v) del volumen de cultivo total), la mezcla de ADN/RPMI se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se añade reserva de PEI (1 mg/mL) a la solución de ADN a una relación de 3:1 (ml de PEI/ $\mu\text{g}$  ADN), y la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. La cultura se agrega suavemente a la mezcla y se arremolina. Los matraces se transfieren a una incubadora a 32°C. En el día 6 después de la transfección, se realiza un análisis de transferencia Western. En el día 7 después de la transfección, se recoge el sobrenadante.

#### Ejemplo de referencia 26: Prueba de expresión de la variante anti-Her2

[0480] Cultivos agitadores de 30 mL, CHO-S en medio FreeStyle; Se usaron 56  $\mu\text{g}$  de ADN en reactivo PEI. 1,5 mM pAF también se usó. En el día 6, se recogió el sobrenadante. El título se determinó mediante Fc ELISA. (Figuras 2 y 3)

#### Ejemplo de referencia 27: Ensayo de inhibición in vitro de la proliferación

[0481] En el día 1, las células fueron sembradas. El medio se aspiró y los matraces de cultivo de células T-225 se enjuagaron con 30 mL de PBS - / . El PBS se aspiró y se añadieron 6 mL de Tripsina-EDTA al 0,25% a cada matraz. Los matraces se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 2-5 minutos. Las células adherentes se desalojaron golpeando el matraz y la tripsina se neutralizó añadiendo 14 mL de medio de cultivo. La suspensión celular se mezcló y se transfirió a un tubo cónico de 50 mL. Las células se centrifugaron a 1200 rpm, 5 min, temperatura ambiente. El sedimento celular resultante se resuspendió en 12 mL de medio de cultivo. Las células se contaron en un hemacitómetro. Las células se sembraron a densidades celulares apropiadas en placas transparentes de 96

pocillos de fondo plano y se incubaron durante la noche a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> para permitir que las células se unieran. El volumen de chapado fue de 80uL/pozo. 80 µL/pocillo de medio de cultivo se utilizó como control "sin células".

**[0482]** Los ejemplos de densidad de placas celulares incluyen:

- BT474 (alto Her2) - 20.000 células/poro en F12k/DMEM (50/50), 10% FBS, P/S
- MDA-MB-468 (Her2 negativo) - 6.000 células/poro en F12k/DMEM (50/50), 10% FBS, P/S
- HCC1954 - 5.000 células/pocillo en RPMI 1640, 10% FBS, P/S
- SKOV-3 - 6.000 células/poro en RPMI 1640, 10% de FBS, P/S
- HT29 - 20.000 células/poro en 5A de McCoy, 10% FBS, P/S

**[0483]** En el día 2, las muestras de prueba se añadieron a las células. Las muestras de prueba se diluyeron en medio de cultivo a una concentración de reserva de 9x en la columna 2 de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se realizaron diluciones en serie 3x desde la columna 2 a la columna 11 con un pipeteador multicanal. Se añadieron 10 uL/pocillo de las muestras anteriores por duplicado a los pocillos apropiados de la placa sembrada. El volumen total en los pozos era aproximadamente 90uL/pozo. Se añadieron 10 uL/pocillo de medio de cultivo para evitar los efectos de borde para los pocillos de muestra. Los pocillos de control de medios se incluyeron en los pocillos internos donde no se añadió muestra (solo 10 µl/pocillo de medio de cultivo) para usar en los cálculos de proliferación. Las placas se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h.

**[0484]** El día 5, se produjo la lectura de la proliferación. Para detectar la proliferación celular, se añadieron 10 uL/pocillo de reactivo WST-8 (Cell Counting Kit-8, cat nº CK04-20, Dojindo Labs) a todos los pocillos. La placa se incubó durante 4 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Las placas se midieron para la absorbancia a una DO de 450 nm. Cálculo de la inhibición de la proliferación de muestras de prueba: reste el valor de OD450 "sin control de células" de todos los valores OD450 de los pocillos; calcule el promedio de los pozos de control de medios (no tratados); calcule el % de valor de Control de Medio de cada muestra con la fórmula: (muestra OD450/OD450 % medio de control de medio) \* 100; calcule el promedio, la desviación estándar y el % CV del % de valores de control de medio de duplicados de cada muestra; trazar el % de valor promedio de control de medio de las muestras frente a la concentración de la muestra; calcule los valores de CI50 usando un análisis de regresión de ajuste logístico de 4 parámetros para determinar la potencia de las muestras de prueba.

**[0485]** La Figura 4 y la Figura 5 ilustran los resultados del ensayo de proliferación *in vitro* con derivados del enlazador de dolastatina y la línea de cáncer de mama HCC1954, Her2 +++. Las Figuras 6 y 7 ilustran los resultados del ensayo de proliferación *in vitro* con derivados del enlazador de dolastatina y la línea de cáncer de ovario SKOV-3, Her2 +++. Las Figuras 8 y 9 ilustran los resultados del ensayo de proliferación *in vitro* con derivados de enlazador de dolastatina y línea de cáncer de mama MDS-MB-468, Her2 negativo.

		Conjunto de datos 1								
Fecha del experimento	9/4/10	9/4/10	9/4/10	9/4/10	9/4/10	9/4/10	9/13/10	9/13/10	9/13/10	
HER2 exp. (literatura/ interno)	+++ / +++	+++ / +++	? / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	?
Sensibilidad in vivo a herceptina	+	+	-	?	-	?	+	-	?	
Muestra	BT474	HCC195 4	LSS13	NCI-N87	SKOV-3	ZR-75-30	BT474	SKOV-3	MDA-MB-175	
Dolastatina	0.1	0.06	0.2	>30	0.2	>30	0.1	0.1	no fit	
NC-D1	2.7	0.9	11	>100	3.7	>100	2.9	2.1	no fit	
NC-D2	2.4	1.5	5.2	>100	3.4	>100	2.8	2.3	no fit	
PHC-D2										
Herceptina	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	
Mab HA121-NC-D1	0.2	0.1	>10	>10	(0.04)*	>10	0.2	no fit	0.3	
Mab HA121-NC-D2	1.0	0.3	>10	>10	0.3	>10	0.4	no fit	0.7	
Mab HA121-PHC-D2										

5

Fab K136pAF	>10	>10	>10	>10	>10	>10			
Fab K136-NC-D1	1.8	0.5	>10	>10	2.5	>10			

10

	Conjunto de datos II				
Fecha del experimento	9/24/10	9/24/10	10/8/10	10/8/10	10/8/10
HER2 exp. (literatura/interno)	++/?	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	-/?
Sensibilidad in vivo a herceptina	unlikely	+	+	-	?
<b>Muestra</b>	<b>HT29</b>	<b>BT474</b>	<b>HCC1954</b>	<b>SKOV-3</b>	<b>MDA-MB-468</b>
Dolastatina	4	2.5	0.04	0.2	<0.01
NC-D1	4	(45)*	<0.01	<0.1	<0.1
NC-D2	4	3	<0.01	(0.1)*	0.3
FHC-D2	12	7	2	8	2
<b>Herceptina</b>	>300	>300	>300	>300	>300
Mab HA121-NC-D1	>10	1	0.2	1.3	>30
Mab HA121-NC-D2	>10	0.8	0.03	(1.3)*	>30
Mab HA121-FHC-D2	5*	2	0.1	0.3	(5.8)*
Fab K136pAF					
Fab K136-NC-D1					

35

40

TABLA 3. Datos

Cancer	Linea celular	KRAS	BRAF	Expresión de EGFR	Molécula pequeña, CI50, nM						
					MMD	NC-D-1	C-D-1	NC-D-2	C225-NC-D-1	C225-HC-D-1	C225-NC-D-2
Piel	A431	w	w	+++	0.1	8.22	18.54		0.06	0.12	0.19
Colon	Cdo 205	w	mut	+	0.25	6.81	40.03		>100	>100	
	HCT-116	mut	w	++	0.13	2.14	24.86	5.7	51.73	>100	62.8
	H1-29	w	mut	++	0.1	4.3		1.7	36.5		16.7
	SW620	mut	w	-	0.14	5		3.2	121		56.8
	HCT-15	mut	w	++	2.65	31.03	>100	>100	>300	>300	
	A549*	mut	w	++	0.19	6.44	39.82	39.82	>100	>100	
Pulmón	H2122	mut	w	+	0.11	12.71	31.76	31.76	>100	>100	
	H460	mut	w	+	0.48	10.4	95.1	95.1	>300	>300	
Próstata	DU145	w	w	++	0.24	4.8	20.51	20.51	>100	>100	

**Ejemplo de referencia 28: Eficacia antitumoral in vivo de Her2-ADC en el modelo animal de xenoinjerto HCC1954 (carcinoma de mama humano)**

[0486] Se obtuvieron células HCC1954 (carcinoma de mama humano) de American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se cultivaron en RPMI + 10% de FBS, 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> hasta 80% de confluencia. Las células se recogieron mediante tripsinización y se suspendieron en PBS a 1 x 10<sup>8</sup> células/mL.

[0487] Se obtuvieron ratones hembras SCID-beige, de 5-8 semanas de edad, de Charles River Laboratories. Las células HCC1954 (humanas, carcinoma de mama, ATCC, n.º CRL-2338) se mezclaron 1:1 con Matrigel (BD Biosciences, Bedford MA) y se inyectaron por vía subcutánea en los ratones. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 100-200 mm<sup>3</sup>, los ratones se clasificaron en grupos de 9-10 ratones cada uno. Las mediciones de pinza se tomaron dos veces por semana hasta el final del estudio. Para estimar el volumen tumoral, se midieron dos diámetros ortogonales con calibres y los valores ingresaron en la fórmula (L x W x W)/2=V, (donde W=el

diámetro más corto, L = el diámetro más largo y V = volumen), para obtener un volumen estimado. El volumen del tumor se convirtió al peso del tumor en el archivo de datos de Excel suponiendo  $1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$ . El punto final se basó en un diseño de estudio de inhibición del crecimiento tumoral (TGI). Cuando el volumen tumoral medio del grupo de control alcanzó aprox.  $1.000 \text{ mm}^3$  todos los ratones fueron sacrificados o el día 28, lo que ocurriera primero.

[0488] Los ratones recibieron una única inyección IV (vena de la cola) el día 1 de la dosificación. El artículo de prueba se disolvió a 4 mg/mL, 2 mg/mL y 0,66 mg/mL y se administró a un volumen de dosis de 5 mL/kg para administrar 20, 10 y 3,3 mg/kg. Los artículos de prueba fueron: grado clínico Herceptin® (Trastuzumab), Her2-HS122-NCD1 (Ab: proporción de fármacos = 1:2, enlazador no escindible), y Her2-HS122/LK145-HCD1 (Ab: proporción de fármacos = 1:4, enlazador escindible) Véase la Figura 16.

#### **Ejemplo de referencia 29: Estudios in vivo de derivado ligado a Her2-Dolastatina**

[0489] Se utilizaron células HCC1954 para este estudio con  $10^7$  células/ratón en Matrigel, SC en el flanco derecho. Los ratones eran hembras SCID-bg de 4-8 semanas. La agrupación se realizó el día 5 después de la implantación celular (tumores  $\sim 100 \text{ mm}^3$ ): se clasificó en 11 grupos de 10 ratones cada uno. Se administró una sola dosis intravenosa el día 1 de la dosificación con cada compuesto en 3 niveles de dosis, 20 mg/kg, 10 mg/kg y 3,3 mg/kg. El volumen del tumor se controló hasta que se alcanzó el punto final ( $1.000 \text{ mm}^3$  o 60 días). (Figura 10) Paclitaxel 25 mg/kg, IV, qod x 5 se empleó como la quimioterapia de control. El vehículo = 50 mM histamina, 0,1 M NaCl, 5% trehalosa, pH 6. Se evaluó el grado clínico de Herceptin® (Trastuzumab), Her2-HS122-NCD1 (enlazador no escindible) y Her2-HS122/LK145-HCD1 (enlazador escindible). (Figuras 11 y 12)

**Tabla 4. Cálculo de T/C (Tratado/Control) para el estudio HCC1954 en el día 28**

Grupon	Regimen de tratamiento 1				Volumen de tumor mediana (mm <sup>3</sup> )	T/C
	Agente	mg/kg	Ruta	Calendario		
1#	10vehículo	-	iv	qdx 1	486	-
2	10trastuzumab	3,3	iv	qdx 1	405	0,833
3	10trastuzumab	10	iv	qdx 1	446	0,918
4	10trastuzumab	20	iv	qdx 1	385	0,792
5	10Her-HS122-NC1D-002	3,3	iv	qdx 1	40	0,082
6	10Her-HS122-NC1D-002	10	iv	qdx 1	14	0,029
7	10Her-HS122-NC1D-002	20	iv	qdx 1	18	0,037
8	10Her-HS122/LK145-HC1D-001	3,3	iv	qdx 1	40	0,082
9	10Her-HS122/LK145-HC1D-001	10	iv	qdx 1	25	0,051
10	10Her-HS122/LK145-HC1D-001	20	iv	qdx 1	18	0,037
11	10paclitaxel	25	iv	qod x 5	18	0,037

#### **Ejemplo de referencia 30: Estudios farmacocinéticos**

[0490] Se realizó un ensayo que detectó la unión del anticuerpo al receptor ErbB2. (Figura 13) Se realizó un ensayo que detectó al menos dos dolastatinas unidas a un anticuerpo (Figura 14).

Figura 15.

#### **Ejemplo de referencia 31: Tratamiento para el cáncer de mama**

Ensayo clínico humano de la seguridad y/o eficacia del derivado de dolastatina unida a trastuzumab para la terapia del cáncer de mama

[0491] Objetivo: comparar la seguridad y la farmacocinética de la composición administrada que comprende derivado de dolastatina unida a trastuzumab.

[0492] Diseño del estudio: este estudio será un estudio de fase I, escalonado de dosis única, aleatorio, de un solo centro, seguido de un estudio de fase II en pacientes con cáncer de mama. Los pacientes no deberían haber estado expuestos al derivado de dolastatina unido a trastuzumab antes de la entrada en el estudio. Los pacientes no deben haber recibido tratamiento para su cáncer dentro de las 2 semanas de comenzar la prueba. Los tratamientos incluyen el uso de quimioterapia, factores de crecimiento hematopoyético y terapia biológica, como los anticuerpos

monoclonales. Los pacientes deben haberse recuperado de todas las toxicidades (al grado 0 o 1) asociadas con el tratamiento previo. Todos los sujetos se evalúan por su seguridad y todas las recolecciones de sangre para el análisis farmacocinético se recogen según lo programado. Todos los estudios se realizan con la aprobación del comité de ética institucional y el consentimiento del paciente.

**[0493]** Fase I: los pacientes reciben derivados de dolastatina unidos a trastuzumab iv los días 1, 8 y 15 de cada ciclo de 28 días. Las dosis de derivado de dolastatina unidas a trastuzumab pueden mantenerse o modificarse según la toxicidad según las evaluaciones que se detallan a continuación. El tratamiento se repite cada 28 días en ausencia de toxicidad inaceptable. Las cohortes de 3-6 pacientes reciben dosis crecientes de derivado de dolastatina unida a trastuzumab hasta que se determina la dosis máxima tolerada (MTD) para el derivado de dolastatina unida al trastuzumab. La MTD se define como la dosis anterior a la que 2 de 3 o 2 de 6 pacientes experimentan toxicidad limitante de la dosis. Las toxicidades que limitan la dosis se determinan de acuerdo con las definiciones y estándares establecidos por la Terminología Común del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) para Eventos Adversos (CTCAE) Versión 3.0 (9 de agosto de 2006).

**[0494]** Fase II: Los pacientes reciben derivado de dolastatina unido a trastuzumab como en la fase I en el MTD determinado en la fase I. El tratamiento se repite cada 4 semanas durante 2-6 ciclos en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. Después de completar 2 cursos de terapia de estudio, los pacientes que logran una respuesta completa o parcial pueden recibir 4 cursos adicionales. Los pacientes que mantienen una enfermedad estable durante más de 2 meses después de completar 6 cursos de terapia de estudio pueden recibir 6 cursos adicionales en el momento de la progresión de la enfermedad, siempre que cumplan con los criterios de elegibilidad originales.

**[0495]** Muestreo de sangre Se extrae sangre en serie mediante punción venosa directa antes y después de la administración del derivado de dolastatina unido a trastuzumab. Se obtienen muestras de sangre venosa (5 mL) para la determinación de las concentraciones séricas aproximadamente 10 minutos antes de la dosificación y aproximadamente los siguientes tiempos después de la dosificación: días 1, 8 y 15. Cada muestra de suero se divide en dos alícuotas. Todas las muestras de suero se almacenan a -20°C. Las muestras de suero se envían en hielo seco.

**[0496]** Farmacocinética: Los pacientes se someten a una muestra de plasma/suero para evaluación farmacocinética antes de comenzar el tratamiento y en los días 1, 8 y 15. Los parámetros farmacocinéticos se calculan por métodos independientes del modelo en un sistema informático VAX 8600 de Digital Equipment Corporation utilizando la última versión del software BIOAVL. Se determinan los siguientes parámetros farmacocinéticos: concentración sérica máxima ( $C_{max}$ ); tiempo para alcanzar la concentración sérica máxima ( $t_{max}$ ); área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC) desde el tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo de sangre ( $AUC_{0-72}$ ) calculado con el uso de la regla trapezoidal lineal; y la vida media de eliminación terminal ( $t_{1/2}$ ), calculada a partir de la constante de velocidad de eliminación. La constante de velocidad de eliminación se estima por regresión lineal de puntos de datos consecutivos en la región lineal terminal de la gráfica de logaritmo de concentración-tiempo. La media, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) de los parámetros farmacocinéticos se calculan para cada tratamiento. Se calcula la relación de los medios de los parámetros (formulación conservada/formulación no conservada).

**[0497]** Respuesta del paciente a la terapia combinada: la respuesta del paciente se evalúa a través de imágenes con rayos X, CT y MRI, y las imágenes se realizan antes de comenzar el estudio y al final del primer ciclo, con imágenes adicionales realizadas cada cuatro semanas o al final de los ciclos posteriores. Las modalidades de imagen se eligen en función del tipo de cáncer y la viabilidad/disponibilidad, y se utiliza la misma modalidad de imagen para tipos de cáncer similares, así como a lo largo del curso de estudio de cada paciente. Las tasas de respuesta se determinan usando los criterios RECIST. (Therasse y col., J. Natl. Cancer Inst. 2000 2 de febrero; 92 (3): 205-16; <http://ctep.cancer.gov/forms/TherasseRECISTJNCI.pdf>). Los pacientes también se someten a biopsia cancer/tumoral para evaluar los cambios en el fenotipo de células cancerígenas progenitoras y el crecimiento clonogénico mediante citometría de flujo, transferencia de Western e IHC, y los cambios en la citogenética por FISH. Después de completar el tratamiento del estudio, los pacientes son seguidos periódicamente durante 4 semanas.

### **Ejemplo de referencia 32: Tratamiento para el cáncer de mama**

Ensayo clínico humano de la seguridad y eficacia del derivado de dolastatina unido a trastuzumab para la terapia del cáncer de mama

**[0498]** Objetivo: comparar la eficacia y la toxicidad del derivado de dolastatina unido a trastuzumab solo seguido de la progresión de la enfermedad por combinación de trastuzumab y paclitaxel versus trastuzumab y paclitaxel de primera línea en mujeres con cáncer de mama metastásico que sobreexpresa HER2.

**[0499]** Diseño del estudio: Este estudio es un estudio aleatorizado y multicéntrico. Los pacientes se estratifican según el grado de sobreexpresión de HER2/neu (2+ frente a 3+), previo tratamiento adyuvante con antraciclina (sin tratamiento previo versus tratamiento previo sin radioterapia en la pared torácica izquierda frente a tratamiento

previo con radioterapia en la pared izquierda del tórax), estado del receptor de estrógenos (positivo frente a negativo frente a desconocido), terapia previa (primera línea versus segunda/tercera línea) y centro. Los pacientes se asignan al azar a uno de los dos brazos de tratamiento. Brazo I: Los pacientes reciben derivado de dolastatina IV unido a trastuzumab durante 30-90 minutos a la semana. Al momento de la progresión de la enfermedad, los pacientes reciben una combinación de derivados de dolastatina IV y paclitaxel IV combinados con trastuzumab como en el brazo II. Brazo II: los pacientes reciben derivado de dolastatina IV unido a trastuzumab durante 30-90 minutos a la semana. Paclitaxel se administra por vía intravenosa durante 1 hora a la semana durante 3 semanas, seguido de 1 semana de descanso.

[0500] El tratamiento continúa en ambos brazos en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. La calidad de vida se evalúa al inicio del estudio y el día 1 de los cursos 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 y 12. Los pacientes son seguidos a los 1, 3 y 6 meses y luego cada 6 meses a partir de entonces.

### ***Ejemplo de referencia 33: Tratamiento para el cáncer de vejiga***

[0501] Objetivo: determinar la toxicidad aguda de paclitaxel y radioterapia con o sin un derivado de dolastatina descrito en la presente memoria en pacientes que se han sometido a resección vesical transuretral previa para carcinoma de células transicionales invasivas de la vejiga.

[0502] Características de la enfermedad: Histológicamente o citológicamente se confirma el carcinoma primario de células de transición (TCC) de la vejiga; evidencia histológica de invasión de la muscularis propia; cumple con 1 de los siguientes criterios de etapa: etapa T2-4a; enfermedad NX, N0 o NI; y M0 o estadio clínico T1, enfermedad de grado 3/3 Y requiere terapia local definitiva; implicación tumoral de la uretra prostática permitida siempre que se cumplan los siguientes criterios: el tumor está visiblemente completamente resecado; no hay evidencia de invasión estromal de la próstata, no hay evidencia de metástasis a distancia por radiografía de tórax o tomografía computarizada Y tomografía computarizada abdominal/pélvica; ha sido sometido a resección transuretral de la vejiga (tan minucioso como sea posible y seguro) en las últimas 3-8 semanas, incluido el examen bimanual con mapeo tumoral; suficiente tejido tumoral disponible para el análisis de Her2/neu; no es un candidato para la cistectomía radical.

[0503] Diseño del estudio: Este estudio es un estudio multicéntrico no aleatorizado. Los pacientes se asignan a 1 de 2 grupos de tratamiento según el estado Her2/neu (tinción Her2/neu2 + o 3+ [grupo 1] frente a tinción Her2/neu 0 o 1+ [grupo 2]). Grupo 1: Los pacientes reciben paclitaxel IV durante 1 hora los días 1, 8, 15, 22, 29, 36 y 43 y un derivado de dolastatina descrito en la presente vía IV durante 90 minutos el día 1 y luego más de 30 minutos los días 8, 15, 22, 29, 36 y 43. Los pacientes también se someten a radioterapia una vez al día los días 1-5, 8-12, 15-19, 22-26, 29-33, 36-40, 43-47, y 50. El tratamiento continúa en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable.

[0505] Grupo 2: Los pacientes reciben paclitaxel y se someten a radioterapia como en el grupo 1, Después de completar el tratamiento del estudio, los pacientes son seguidos a las 4-5 semanas, cada 3 meses durante 1 año, cada 4 meses durante 1 año, cada 6 meses durante 3 años, y luego anualmente a partir de entonces.

### ***Ejemplo de referencia 34: Tratamiento para el cáncer de ovario***

Ensayo clínico humano de la seguridad y eficacia del derivado de dolastatina descrito en este documento para la terapia del cáncer de ovario

[0506] Objetivo: evaluar la seguridad y eficacia de una dosificación IV semanal de cuatro semanas de una composición que comprende un derivado de dolastatina descrito en la presente memoria en mujeres con cáncer de ovario que sobreexpresa Her2.

[0507] Diseño del estudio: Este estudio es un estudio multicéntrico no aleatorizado, abierto, de 11 semanas. Este estudio evaluará el perfil de seguridad de cuatro dosis IV una vez a la semana, la MTD, PK e inmunogenicidad del derivado de dolastatina unido a trastuzumab. Los pacientes se asignan a un solo grupo. Los pacientes reciben una dosis de derivado de dolastatina unido a trastuzumab una vez a la semana durante 4 semanas. El derivado de dolastatina unido a trastuzumab se administrará por infusión IV en los días de estudio 1, 8, 15 y 22. Las muestras de orina se tomarán los días 1 y 22.

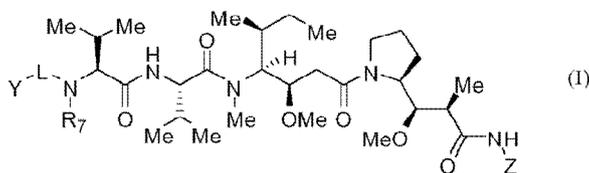
[0508] Muestreo de sangre Se extrae sangre en serie mediante punción venosa directa antes y después de la administración del derivado de dolastatina. Se obtienen muestras de sangre venosa (5 mL) para la determinación de las concentraciones séricas aproximadamente 10 minutos antes de la dosificación y aproximadamente los siguientes tiempos después de la administración: días 1, 2, 4, 5, 8, 15, 22, 36, 43 y 50 Cada muestra de suero se divide en dos alícuotas. Todas las muestras de suero se almacenan a -20°C. Las muestras de suero se envían en hielo seco. El tratamiento continúa en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. La calidad de vida evaluada al inicio y el día 1 de los cursos 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 y 12. Los pacientes son seguidos en los días 29, 36, 43 y 50. Se les preguntará a los pacientes sobre los eventos adversos. Los pacientes tendrán una exploración por

imágenes y un ECG para evaluar el tamaño del tumor y la función cardíaca (día 43). Al finalizar el estudio, los pacientes tendrán un examen físico el día 50). Los pacientes con evidencia de regresión de la enfermedad pueden recibir terapia continua hasta que se documente la evidencia de la progresión de la enfermedad.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene:

5 (i) Fórmula (I):



15 en donde:

Z tiene la estructura de:



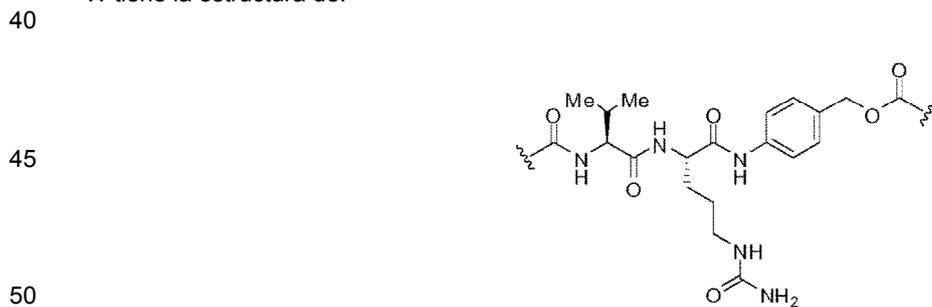
R<sub>5</sub> es H, COR<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o tiazol;  
 R<sub>8</sub> es OH o -NH-(alquilen-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>;  
 R<sub>6</sub> es OH o H;  
 Ar es fenilo o piridina;

R<sub>7</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o hidrógeno;

Y se selecciona del grupo que consiste en una hidroxilamina;

L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en -alquilen-, -alquilen-C(O)-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-, -  
 35 (alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-C(O)-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n'</sub>-NHC(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n''</sub>-C(Me)<sub>2</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n'''</sub>-NHC(O)-(alquilen-O)<sub>n''''</sub>-  
 alquilen-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-W-, -alquilen-C(O)-W-, -(alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-U-alquilen-C(O)- y -  
 (alquilen-O)<sub>n</sub>-alquilen-U-alquilen-;

W tiene la estructura de:



U tiene la estructura de:



o L está ausente, Y es metilo, R<sub>5</sub> es COR<sub>8</sub>, y R<sub>8</sub> es -NH-(alquilen-O)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>; y

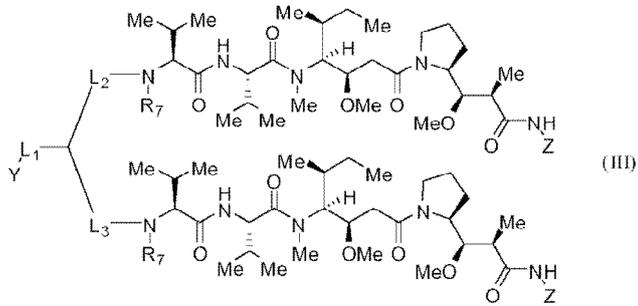
65 cada n, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores que o iguales a uno;

o una sal del mismo;  
 (ii) Fórmula (III), (IV), (V) o (VI):

5

10

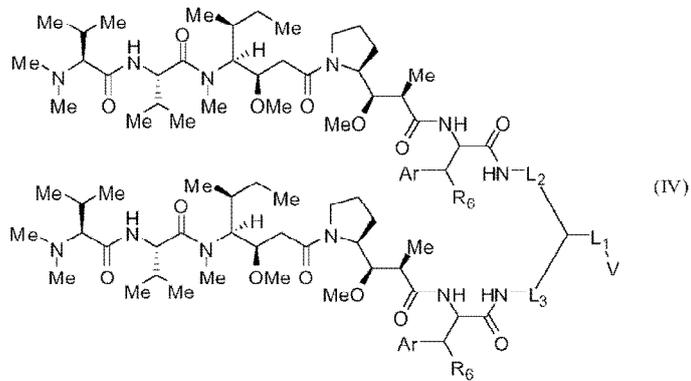
15



20

25

30

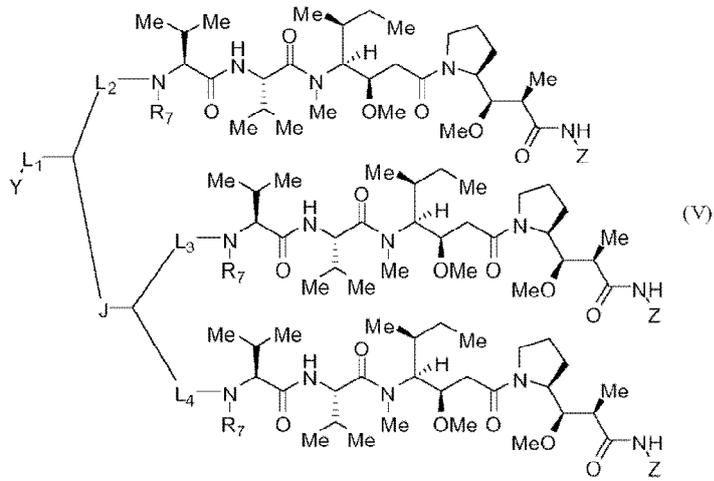


35

5

10

15



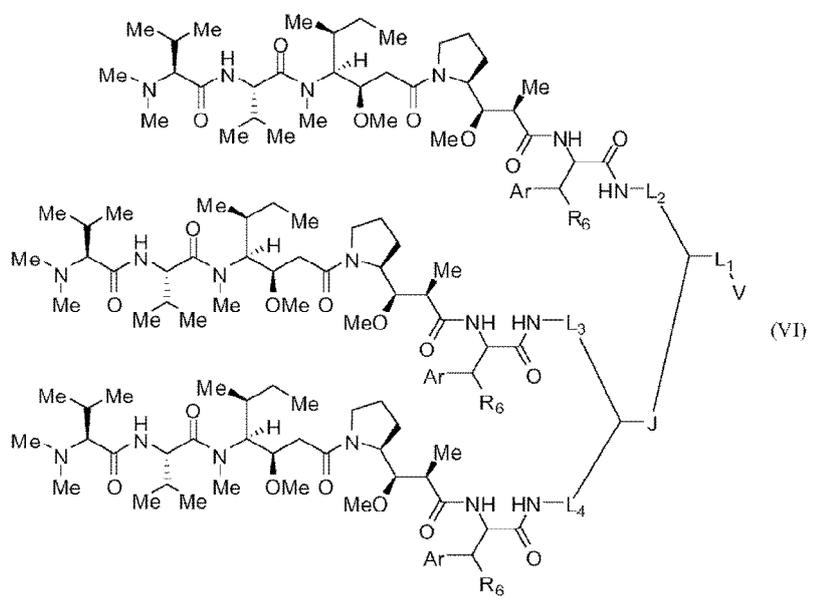
20

25

30

35

40

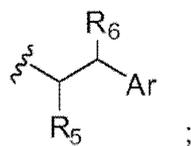


en donde:

45

Z tiene la estructura de:

50



55

R<sub>5</sub> es H, COR<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o tiazol;

R<sub>8</sub> es OH;

R<sub>6</sub> es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

60

R<sub>7</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o hidrógeno;

Y y V se seleccionan cada uno del grupo que consiste en una hidroxilamina;

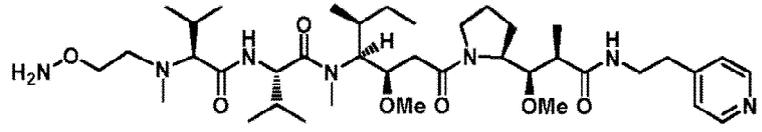
65

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> son cada uno de los enlaces seleccionados independientemente del grupo que consiste en un enlace, -alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-, -alquileo'-J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J'-, -(alquileo-O)<sub>n</sub>-alquileo-J-alquileo'-, -W-, -alquileo-W-, alquileo'-J-(alquileo-NMe)<sub>n</sub>-alquileo-W-, -J-(alquileo-NMe)<sub>n</sub>-alquileo-W-, -J-alquileo-NMe-alquileo'-NMe-

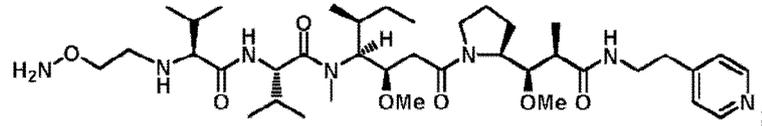




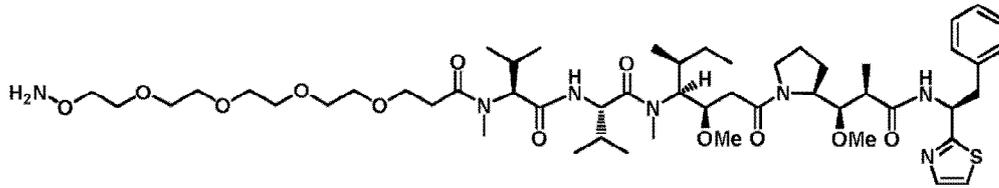
5



10

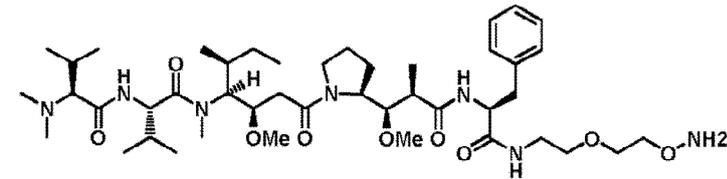


15



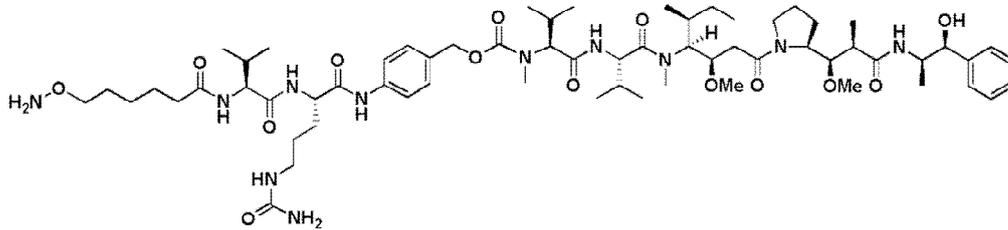
20

25



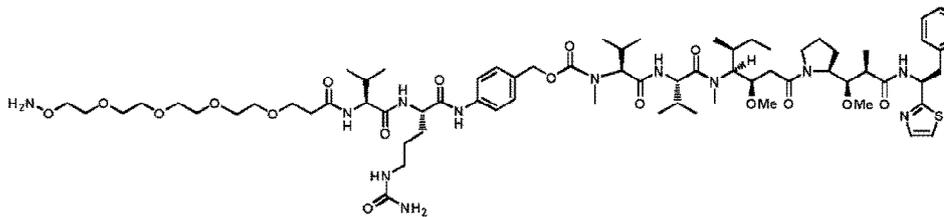
30

35



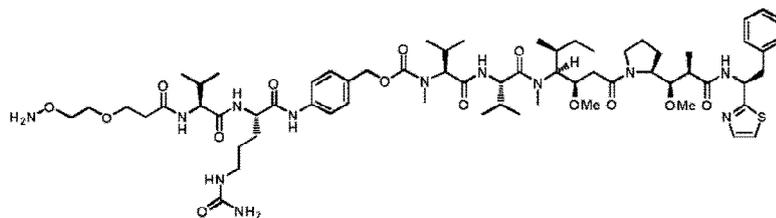
40

45



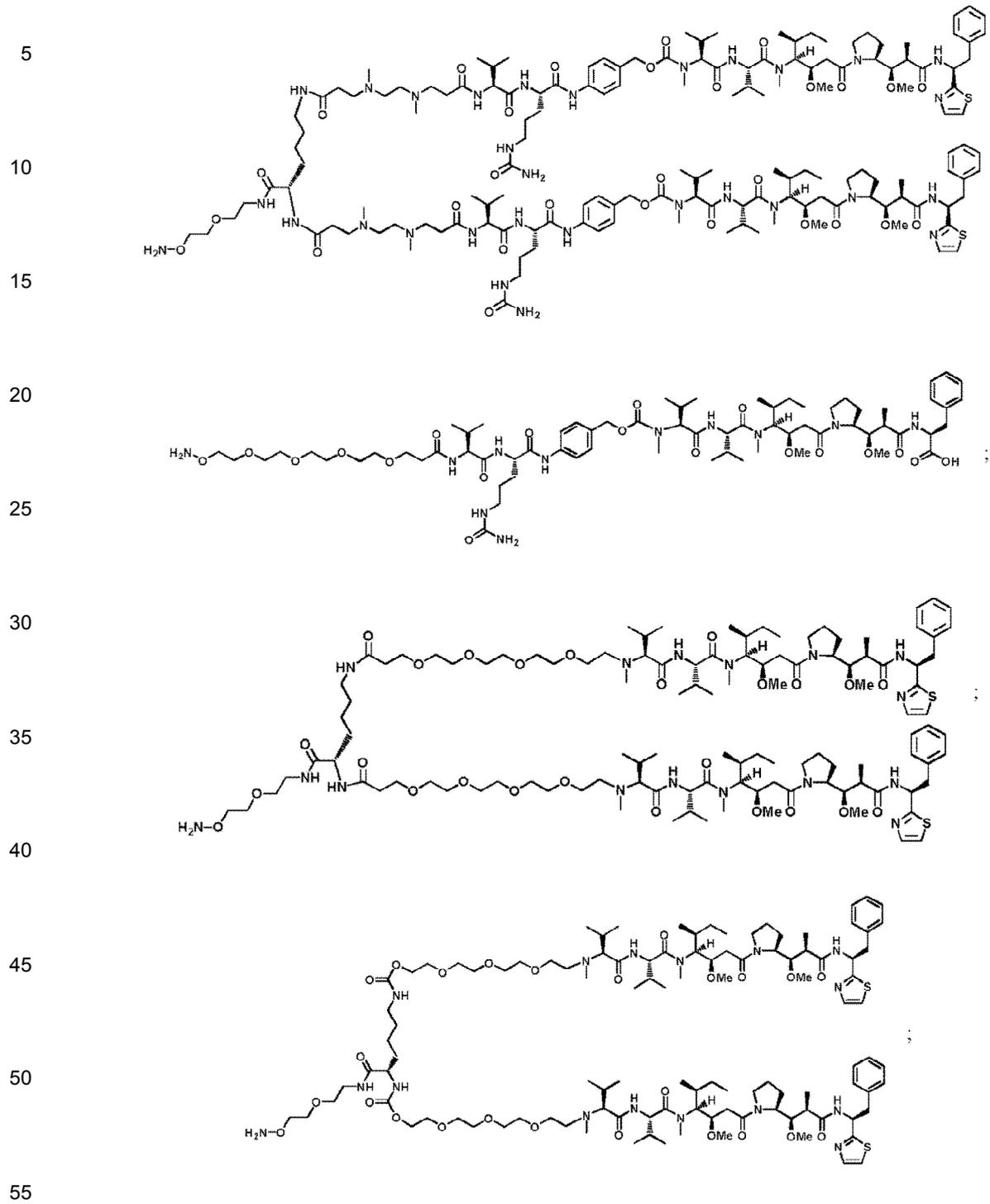
50

55

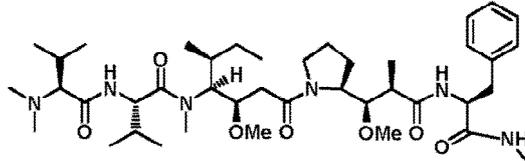


60

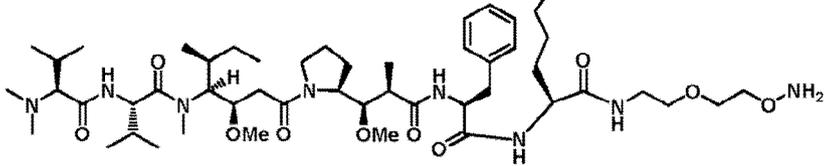
65



5



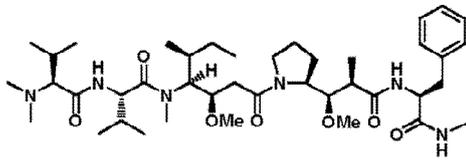
10



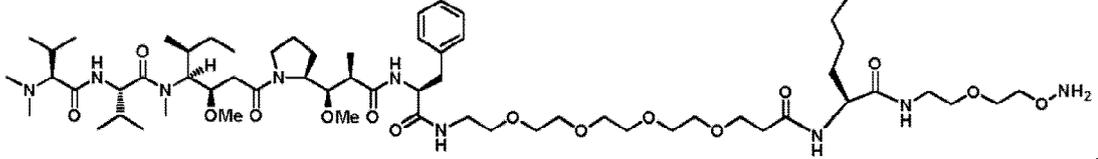
15

; o

20



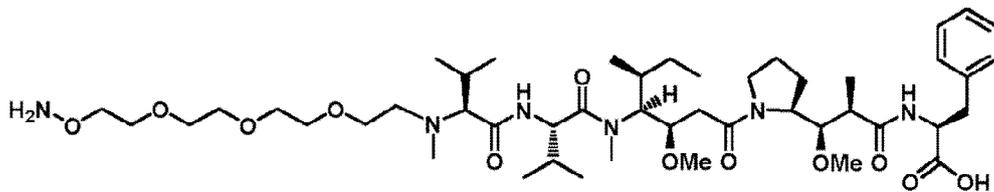
25



30

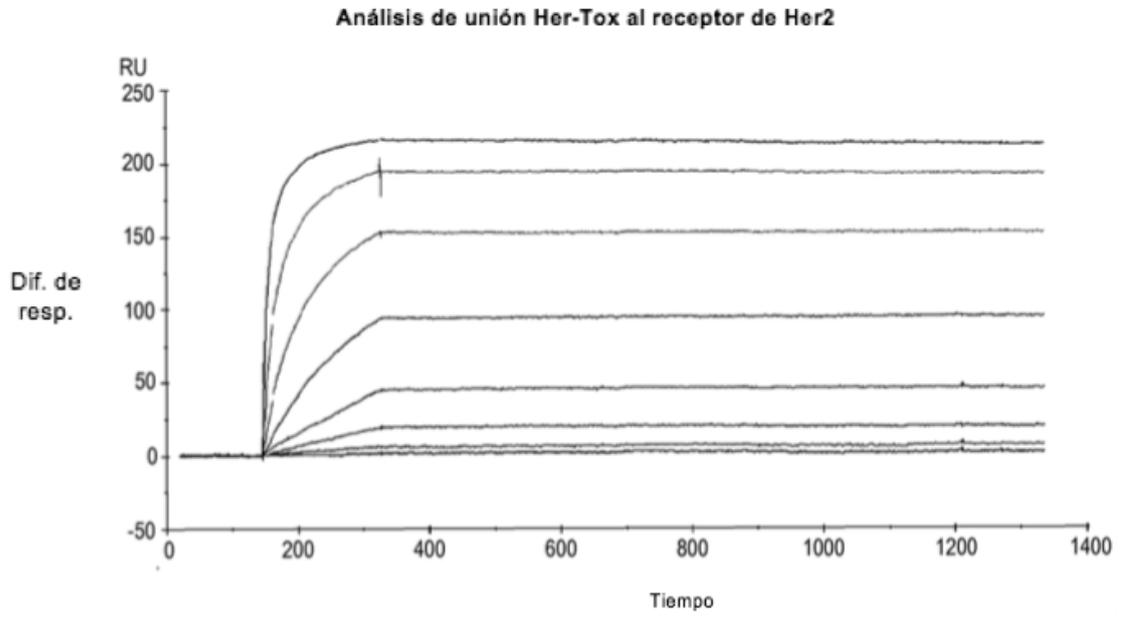
7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la Fórmula (I) es:

35



40

45



**FIG. 1**

Prueba de expresión de variante anti-Her2

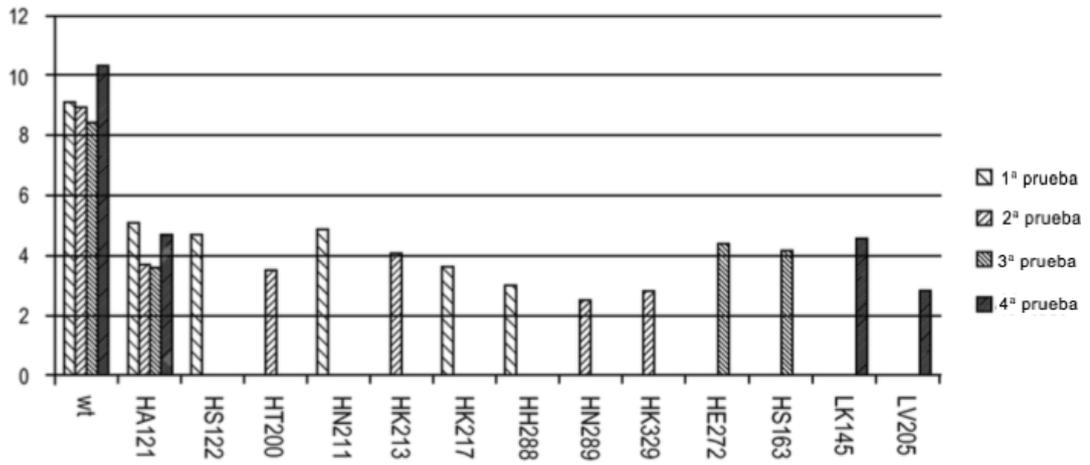


FIG. 2

Prueba de expresión de variante anti-Her2

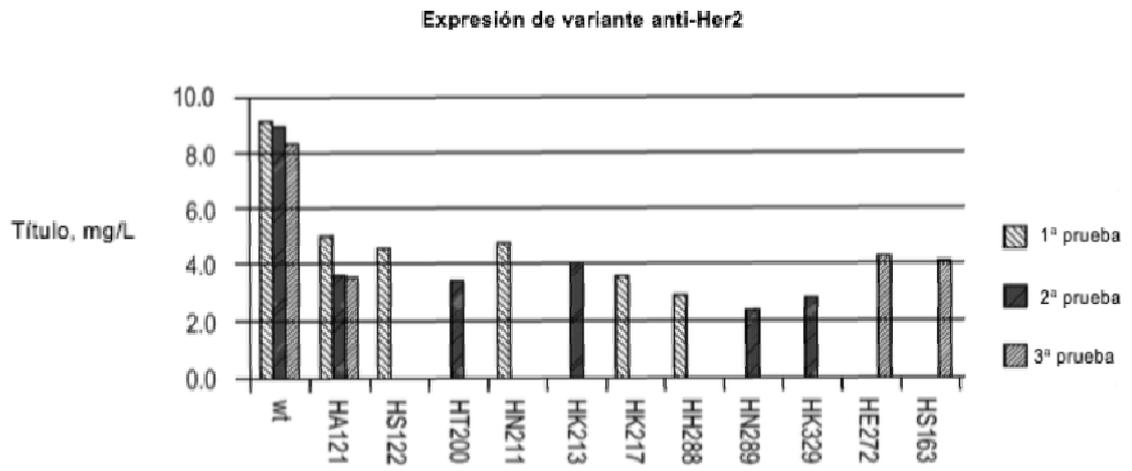
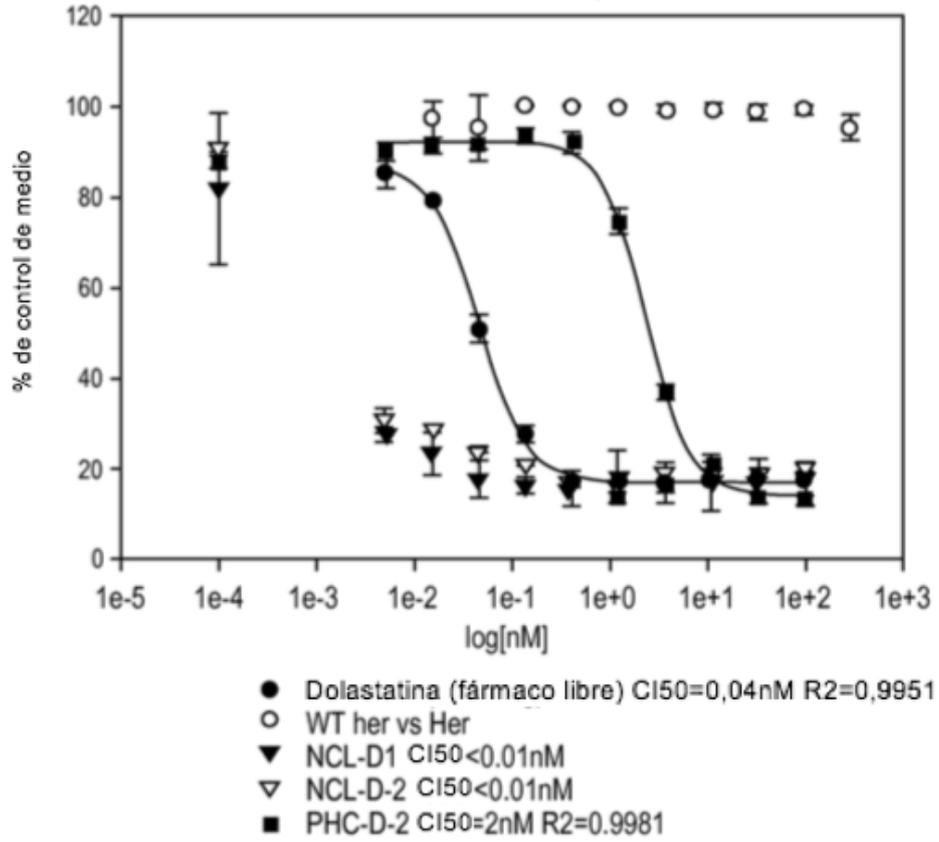


FIG. 3

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

Ensayo de proliferación HCC1953  
enlazador de dolastatina 100810, IV



**FIG. 4**

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

Ensayo de proliferación HCC1954  
Conjugados de Herx-tox, 100810, IV

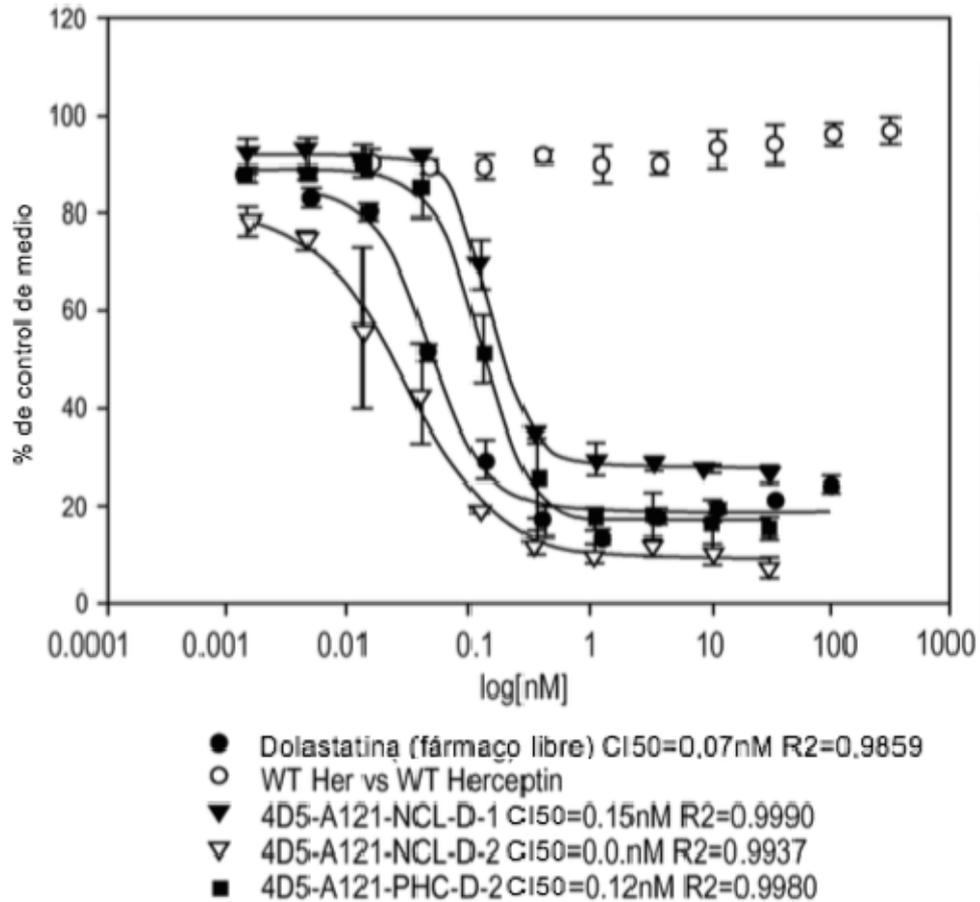
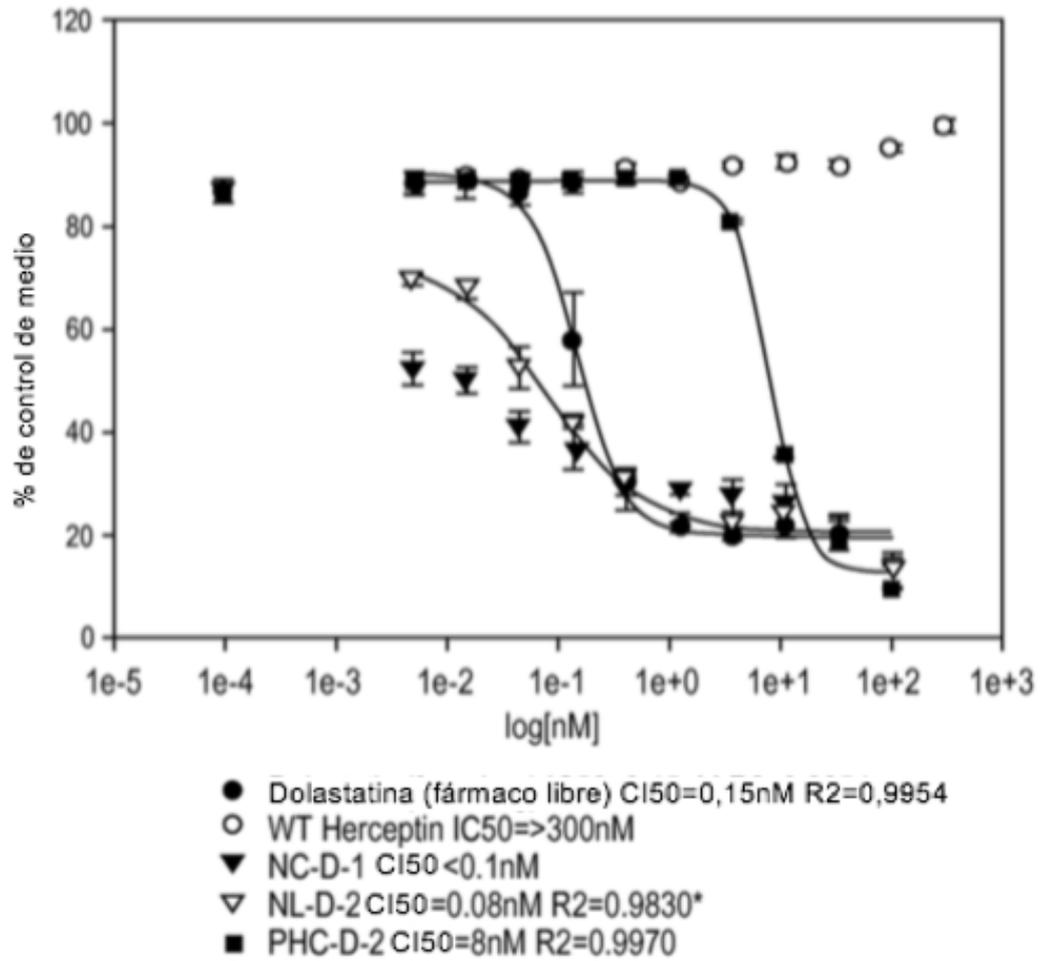


FIG. 5

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

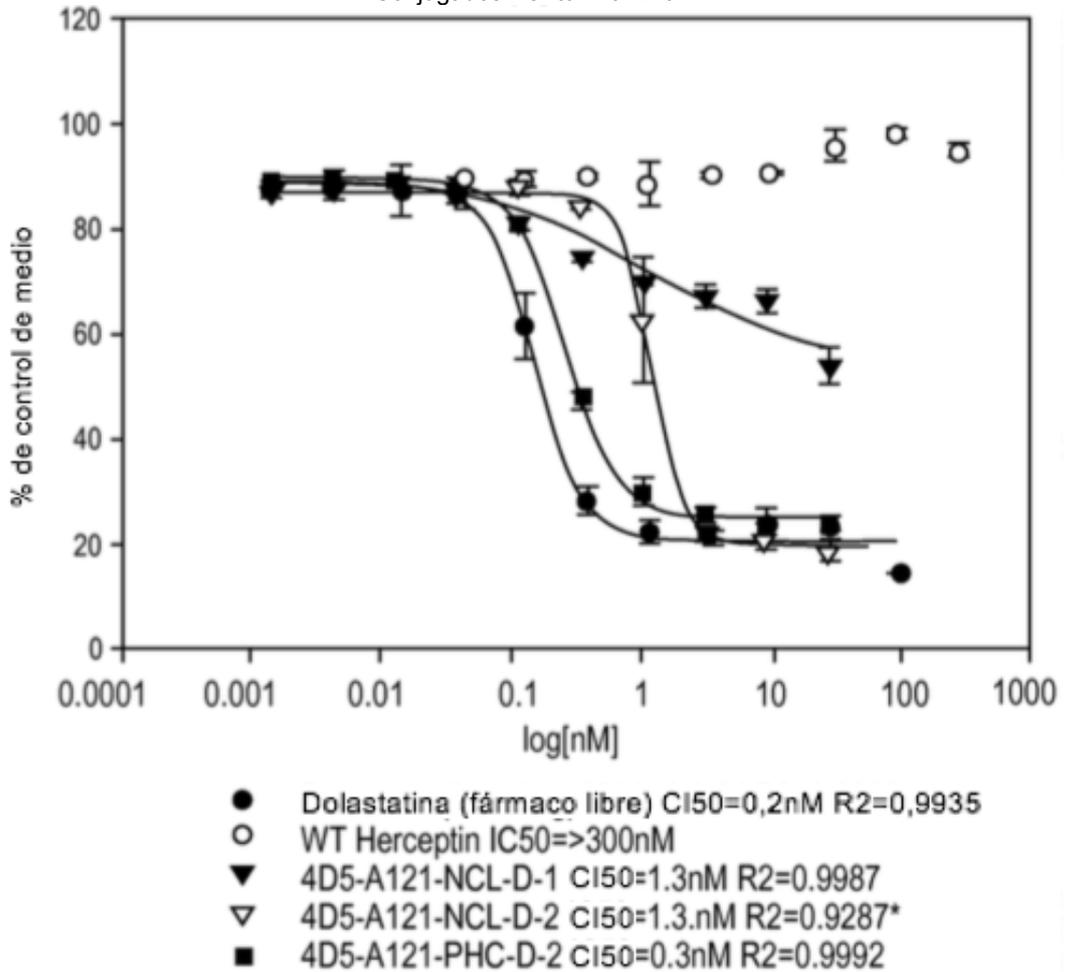
Ensayo de proliferación SKOV3



**FIG. 6**

Ensayo de proliferación con línea de cancer ovárico SKOV-3 y conjugados de Her-tox

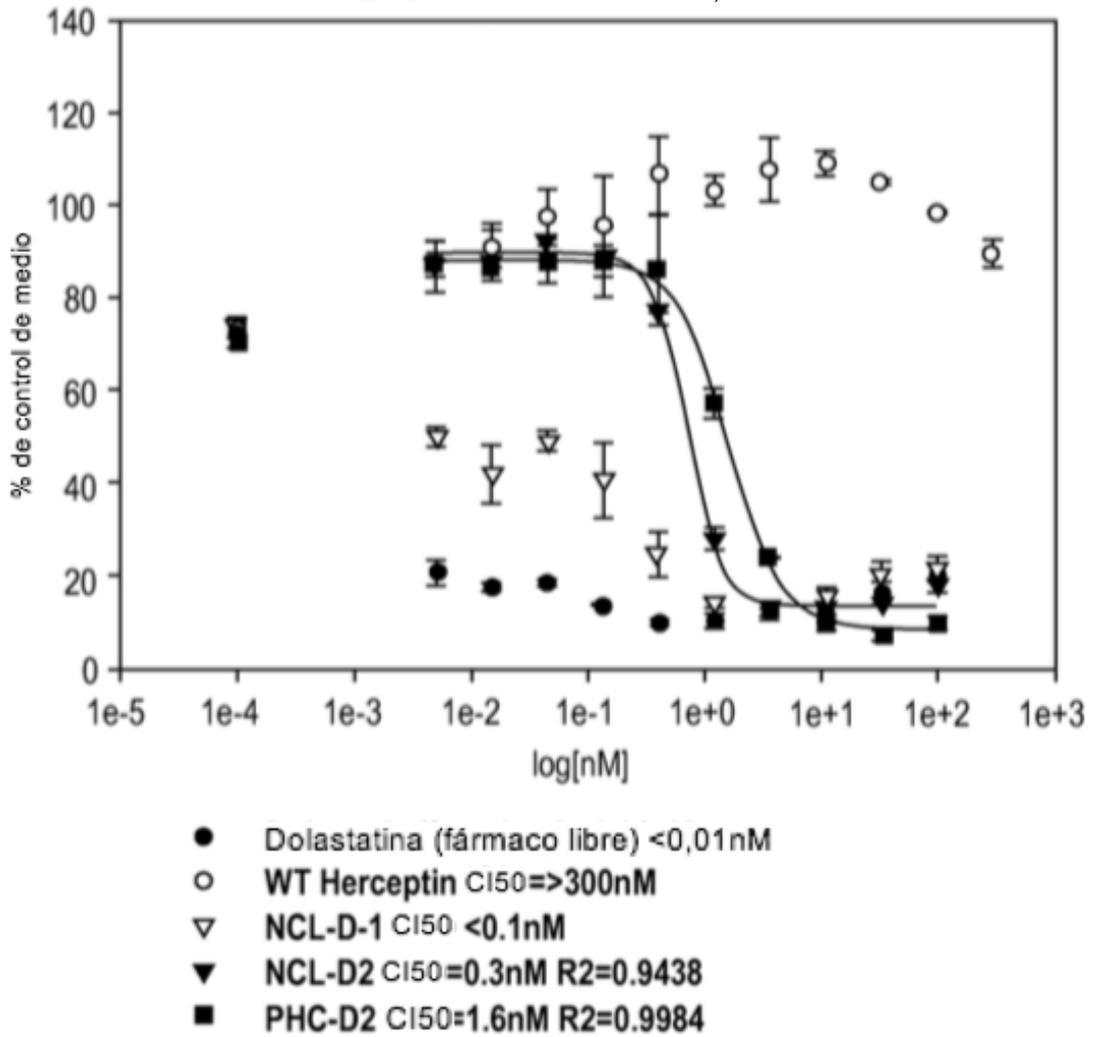
Ensayo de proliferación SKOV3  
Conjugados Her-tox 101210 IV



**FIG. 7**

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

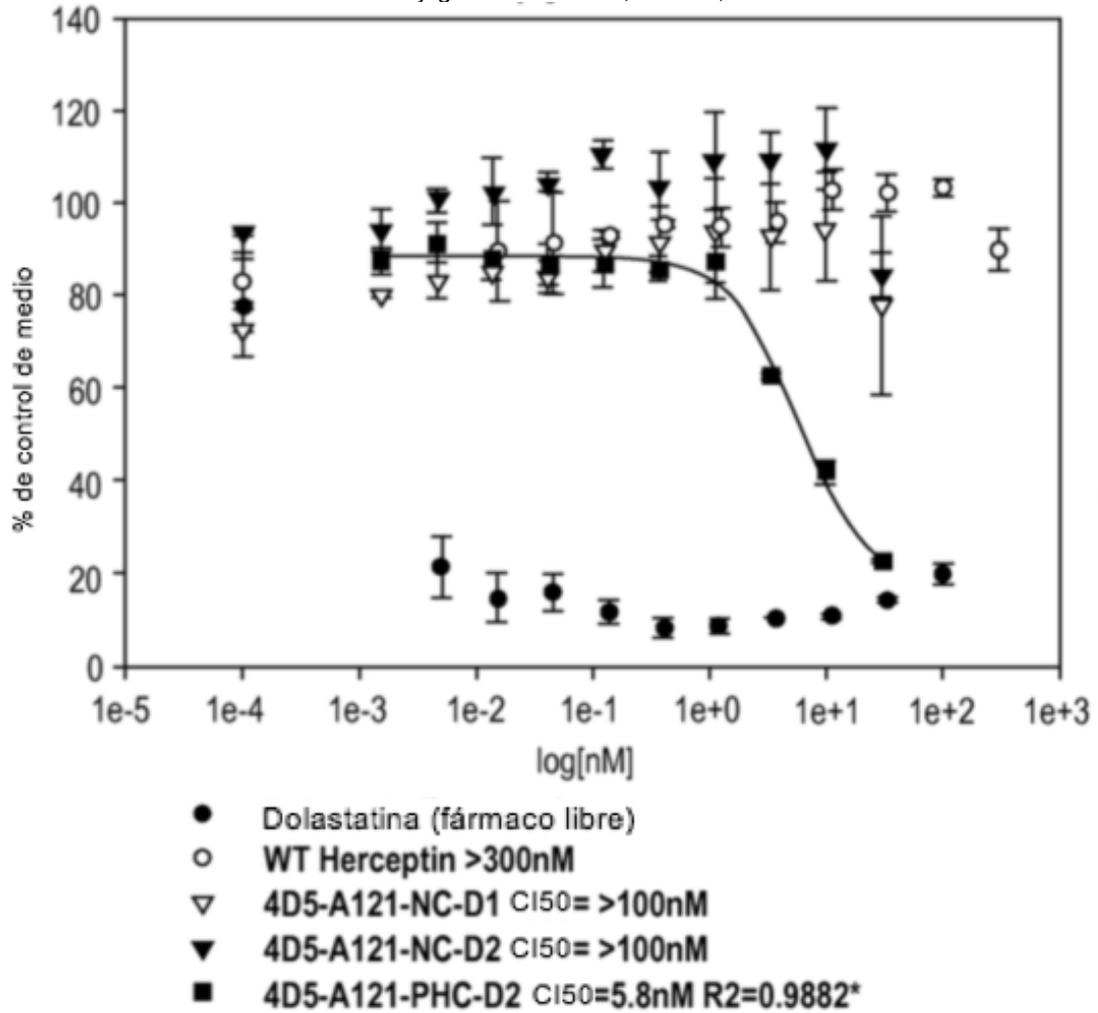
Ensayo de proliferación MDA-MB-468  
Enlazador de dolastatina 100810, IV



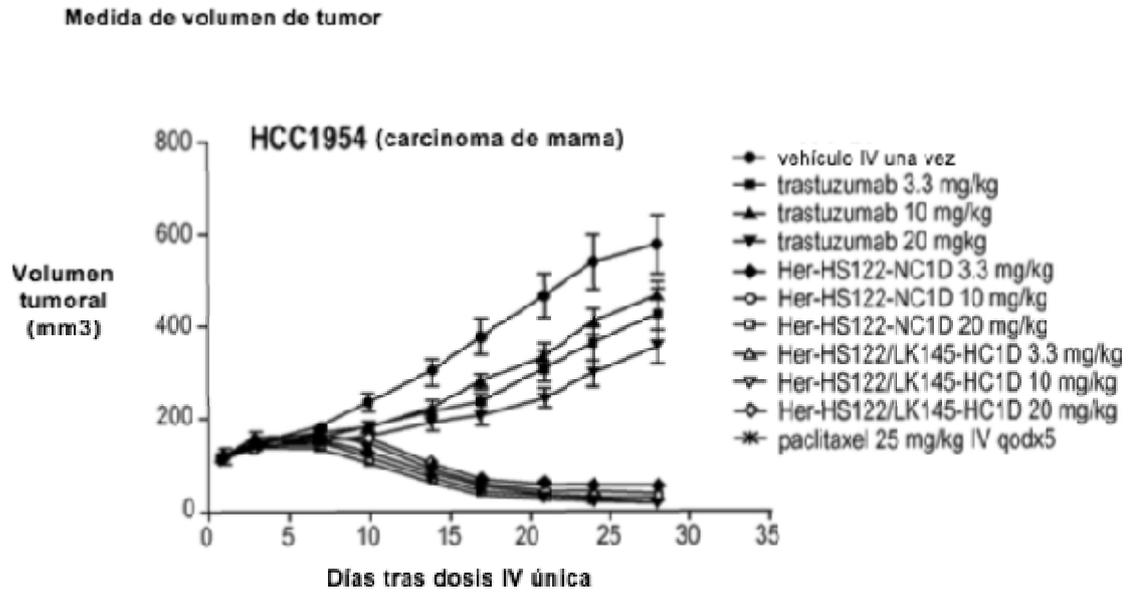
**FIG. 8**

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

Ensayo de proliferación MDA-MB-468  
 Conjugados de Her-tox, 100810, IV



**FIG. 9**



**FIG. 10**

Formatos de ensayo utilizados para medir la concentración de derivado de dolastatina ligada a HER2 en suero de ratón dolastatina de molécula pequeña (SM)

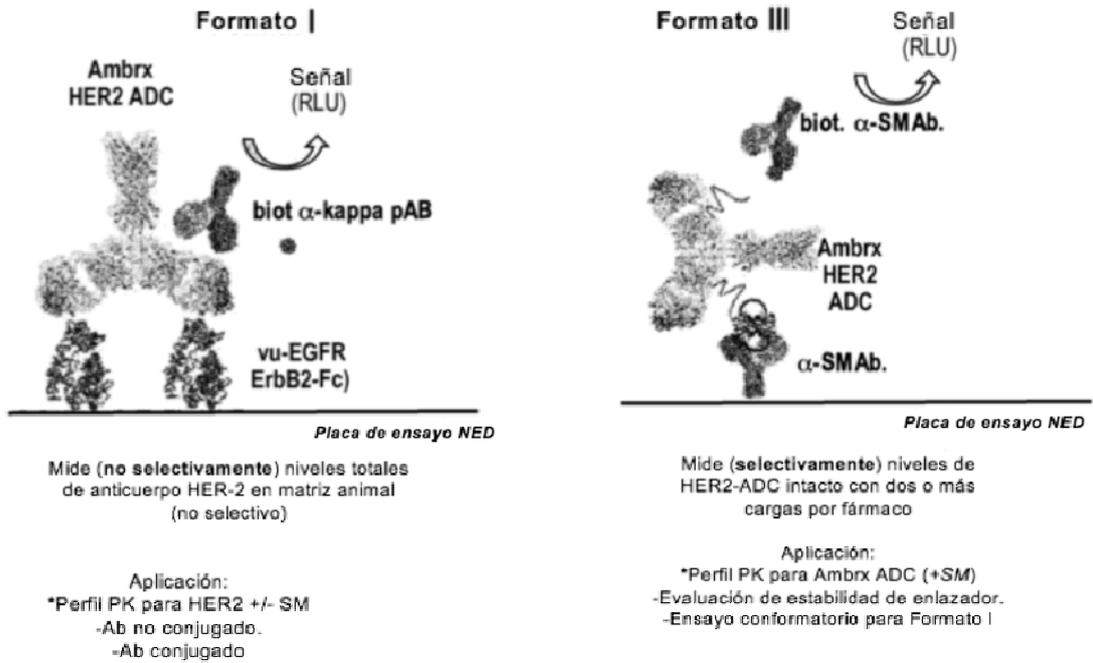


FIG. 11

Resultados PK de ratón: Concentraciones de suero de derivados de dolastatina enlazados con trastuzumab

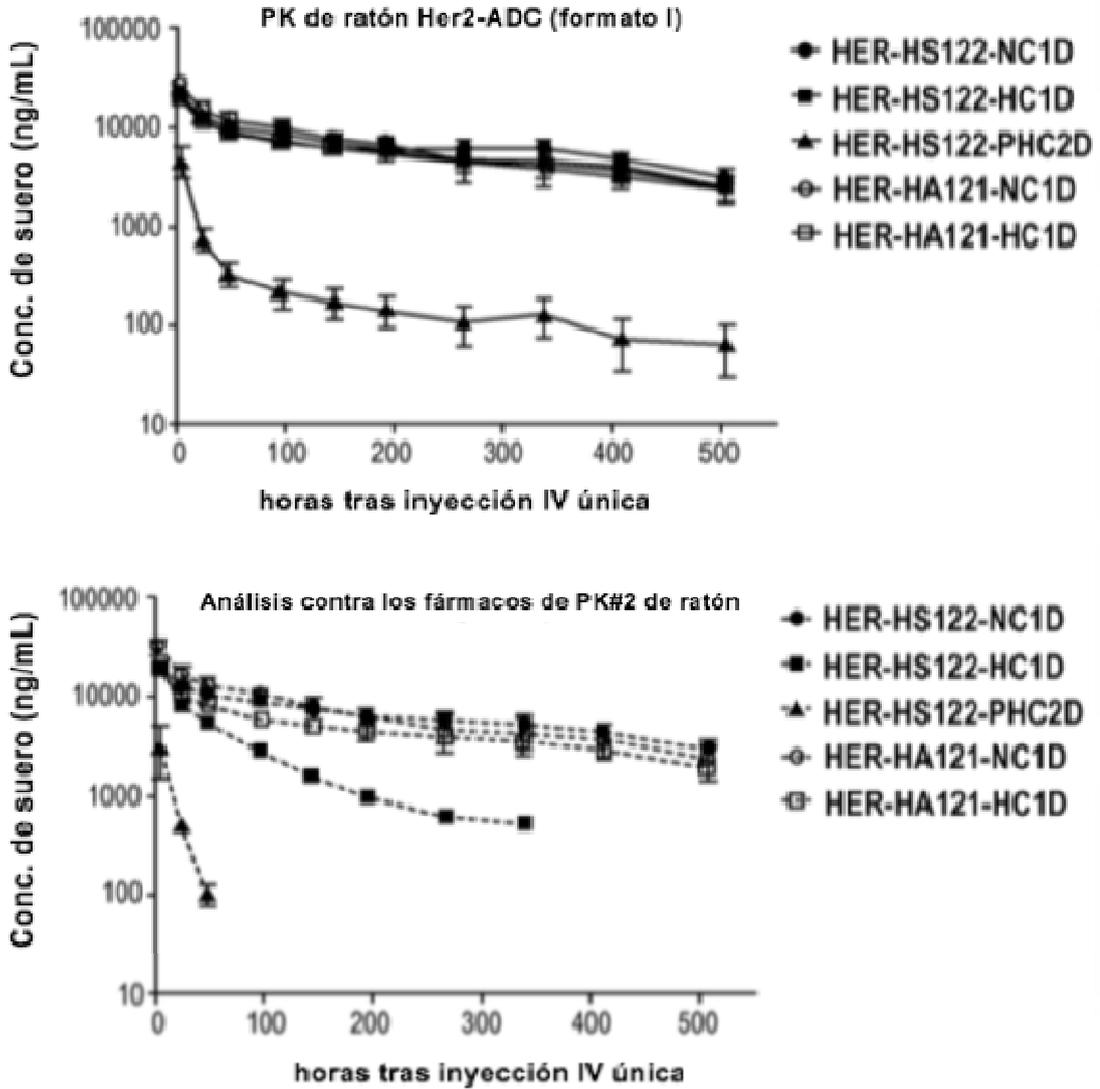


FIG. 12

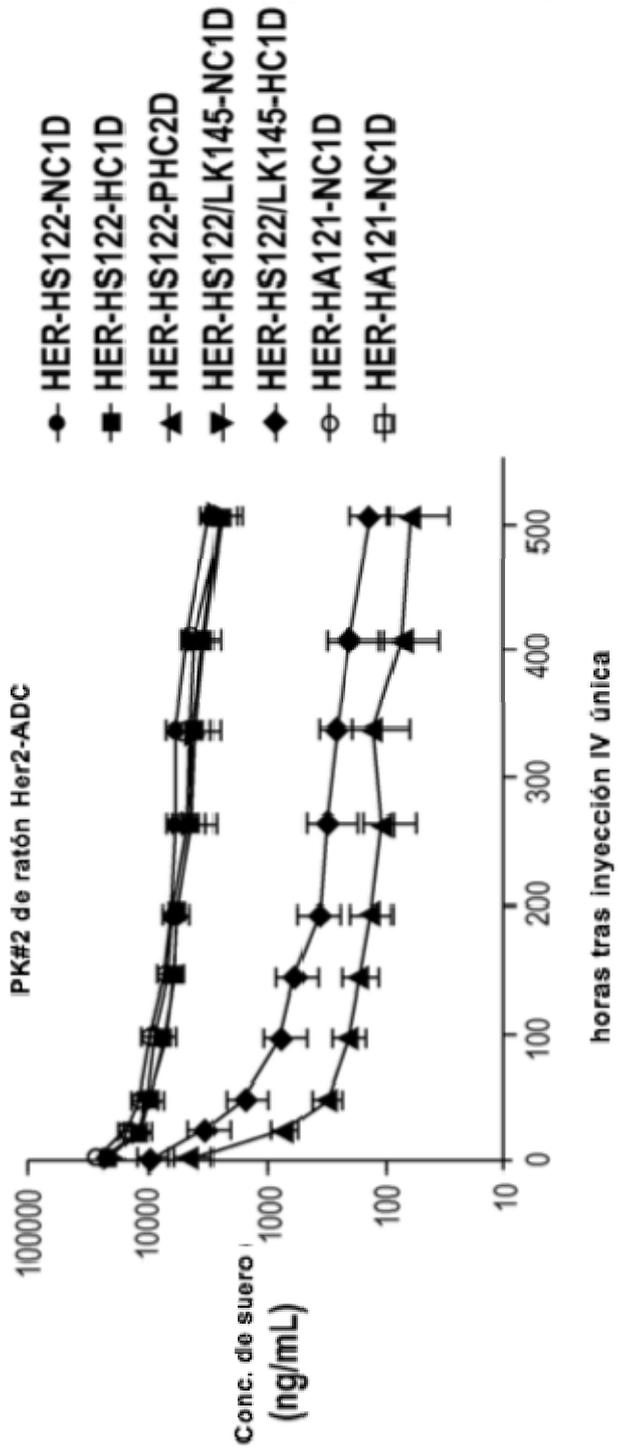


FIG. 13

Medidas de estabilidad in vivo que detectan al menos dos derivados de dolastatina enlazados a trastuzumab

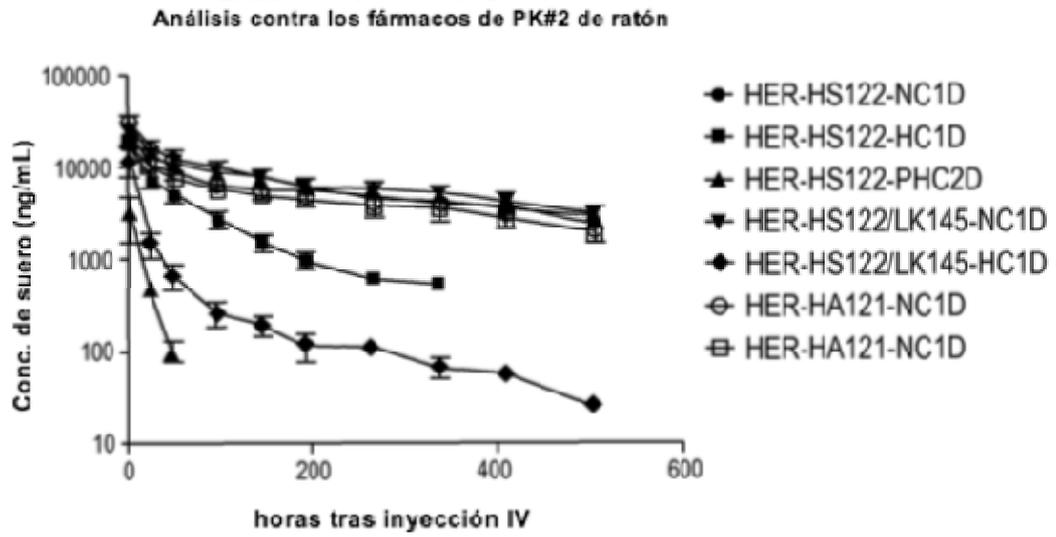
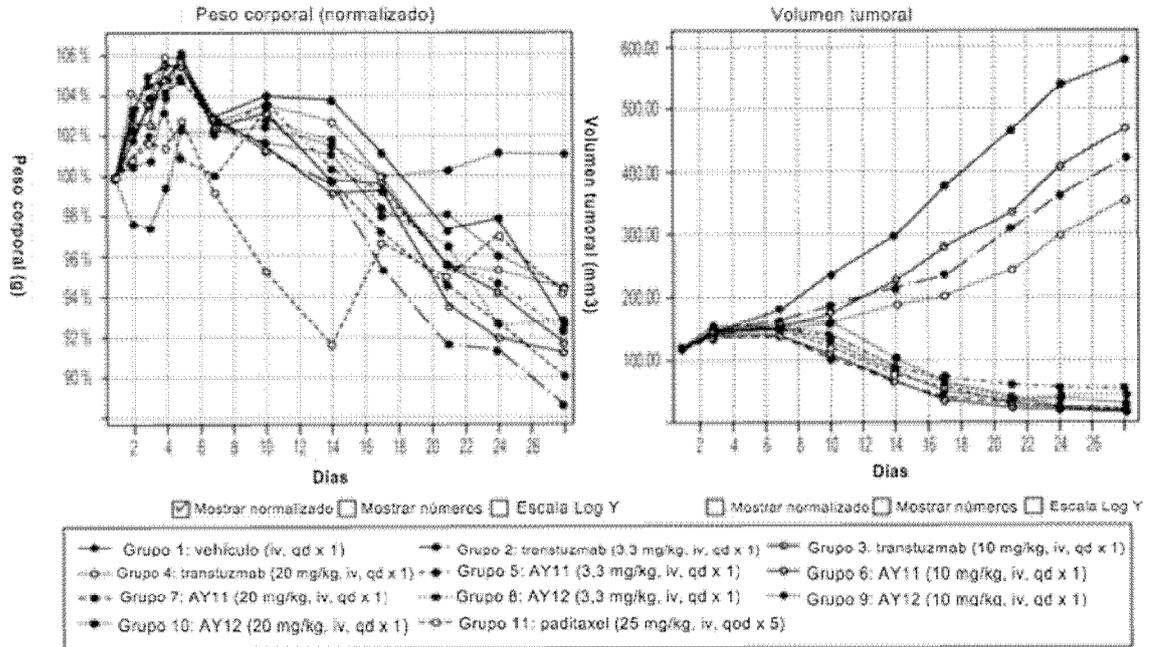


FIG. 14

**Datos PK de ratón con derivados de dolastatina enlazados con trastuzumab**

Datos de resumen medios de grupo HCC1954-e202 (TV = 1.000 mm<sup>3</sup> o Día 60)



**FIG. 15**

Eficacia anti-tumor de derivados enlazados a trastuzumab

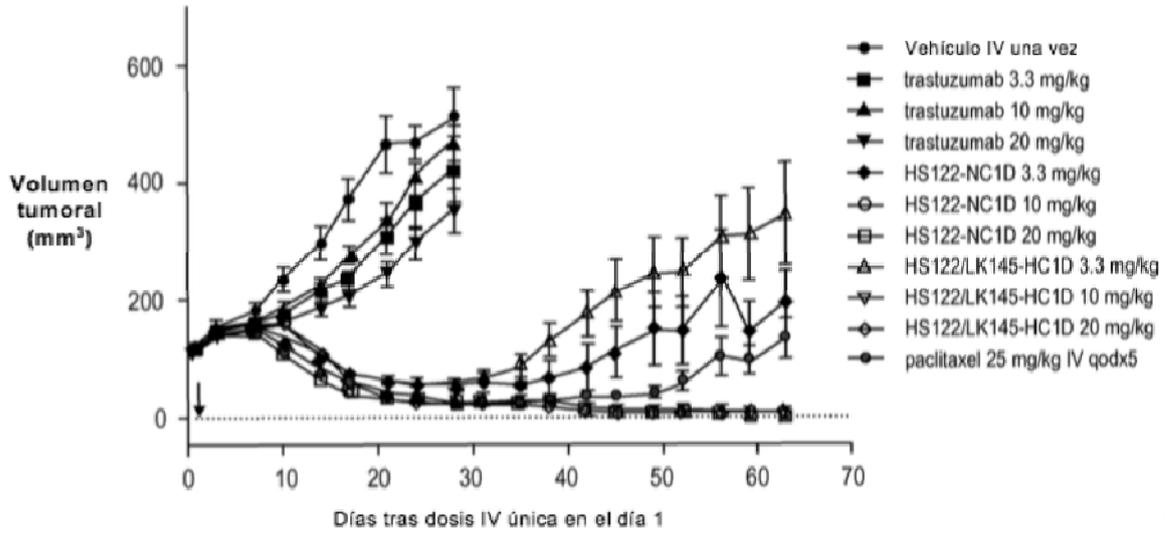


FIG. 16

Eficacia anti-tumor de derivados enlazados a dolastatina

Mama MDA361DYT2 (2+)

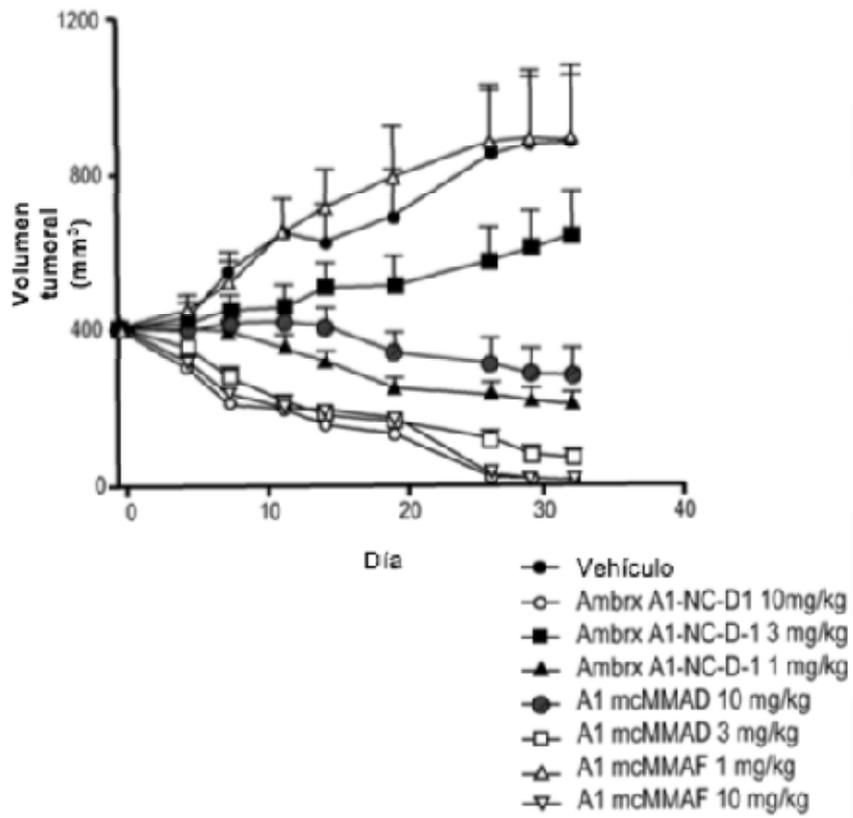
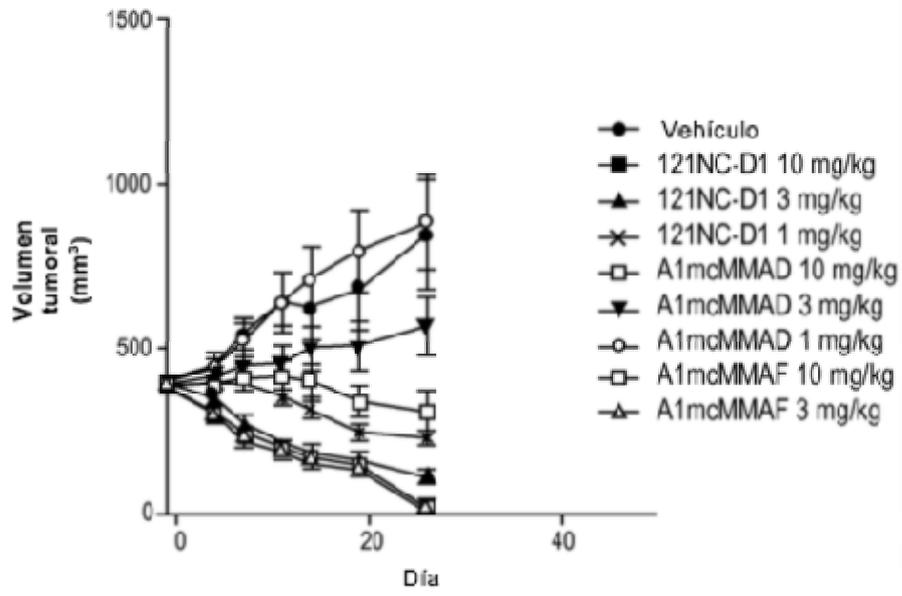


FIG. 17

**Eficacia anti-tumor de derivados enlazados a dolastatina**

Modelo de xenoinjerto de Mama MDA361DYT2 (2+)



**FIG. 18**